

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Medicinska kemija

Dajana Busić

**Istraživanje derivata vitamina B<sub>6</sub> jednodimenzijским i  
dvodimenzijским tehnikama NMR**

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Medicinska kemija

Dajana Busić

**Istraživanje derivata vitamina B<sub>6</sub> jednodimenzijским i  
dvodimenzijским tehnikama NMR**

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

Mentor rada: prof. dr. sc. Dražen Vikić-Topić

Komentor rada: dr. sc. Sunčica Roca

## **Zahvala**

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr. sc. Draženu Vikić-Topiću, koji mi je omogućio izradu diplomskog rada u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković. Svojim smjernicama vodio me kroz izradu diplomskog rada.*

*Veliku zahvalnost dugujem i komentorici dr. sc. Sunčici Roci koja mi je bila velika podrška tijekom provedbe eksperimentalnog dijela izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim članovima Centra za NMR na savjetima i podršci, a posebno mr. sc. Željku Mariniću na prenesenom znanju iz područja spektroskopije NMR.*

*Zahvaljujem i Mateji Đud, dipl. inž. na savjetima i pomoći pri snimanju spektara IR zračenja te Lidiji Brkljačić, dipl. inž. na uloženom trudu i vremenu pri snimanju spektara spektrometrije masa.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Mileni Jadrijević-Mladar Takač na pomoći pri sintezi dijela spojeva korištenih u mom diplomskom radu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci koju su mi pružali tijekom petogodišnjeg studiranja.*

*Dajana*

Diplomski rad obranjen je dana 27. rujna 2018. godine  
pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Dean Marković
2. doc. dr. sc. Karlo Wittine
3. prof. dr. sc. Dražen Vikić-Topić

Rad ima 60 stranica, 37 + D16 slika, 1 tablicu i 29 literaturnih navoda.

## SAŽETAK

U sklopu ovog istraživanja sintetizirani su novi spojevi derivata vitamina B<sub>6</sub> i to piridoksina s aminokiselinama (alanin i fenilalanin), te neutralnog piridoksala s primarnim aminom (2-amin-4-klorfenol) u molarnom omjeru 1 : 1. Amino skupina alanina zaštićena je s *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom (Boc), a fenilalanina s karboksibenzil zaštitnom skupinom (Z). Oba aminokiselinska estera dobivena su reakcijom aminokiselina s dicikloheksilkarbodiimidom (DCC) i  $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksinom. Schiffova baza prethodno neutraliziranog piridoksala hidroklorida dobivena je njegovom reakcijom s 2-amin-4-klorfenolom.

Dobiveni spojevi okarakterizirani su 1D i 2D spektroskopijom NMR u otopini, spektrometrijom masa (ESI-MS) te spektroskopijom IR zračenja u čvrstom stanju. Od 1D tehnika NMR korištene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C APT, a od 2D <sup>1</sup>H—<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H—<sup>1</sup>H NOESY, <sup>1</sup>H—<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H—<sup>13</sup>C HMBC i <sup>1</sup>H—<sup>15</sup>N HMBC.

**Ključne riječi:** alanin / fenilalanin / piridoksal / piridoksin / Schiffova baza

## SUMMARY

Three compounds of vitamin B<sub>6</sub> derivatives were prepared by reaction of pyridoxine with amino acids (alanine and phenylalanine), and by reaction of neutral pyridoxal and primary amine (2-amino-4-chlorophenol). As *N(alpha)*-amino protecting group, *tert*-butoxycarbonyl (Boc-Ala) and carboxybenzyl group (Z-Phe) were used. Both aminoacids esters were prepared by reaction of aminoacids with *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and  $\alpha^4, \alpha^5$ -isobutylidene pyridoxine. Schiff's base was synthesized by reaction of neutral pyridoxal and 2-amino-4-chlorophenol.

All synthesized compounds were identified by NMR spectroscopy in solution and mass spectrometry. Used one-dimensional NMR techniques were <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C APT, while the two-dimensional used techniques were <sup>1</sup>H—<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H—<sup>1</sup>H NOESY, <sup>1</sup>H—<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H—<sup>13</sup>C HMBC and <sup>1</sup>H—<sup>15</sup>N HMBC. In solid state the compounds were characterized by IR spectroscopy.

**Key words:** alanine / phenylalanine / pyridoxal / pyridoxine / Schiff bases

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Vitamin B <sub>6</sub> i njegovi derivati .....	1
1.2. Schiffove baze.....	4
1.3. Zaštitne skupine kod aminokiselina i njihova uloga .....	6
1.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) .....	8
2. CILJ RADA .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Kemikalije.....	14
3.2. Priprava derivata vitamina B <sub>6</sub> .....	14
3.2.1. Z-L-Phe- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin ( <b>P1</b> ) .....	14
3.2.2. Boc-Ala- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin ( <b>P2</b> ) .....	14
3.2.3. N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalamin ( <b>P3</b> ) i N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalimin ( <b>P4</b> ) .....	14
3.3. Spektroskopija NMR u otopini.....	15
3.4. Spektrometrija masa.....	16
3.5. Spektroskopija infracrvenog zračenja .....	16
4. REZULTATI .....	17
4.1. Z-L-Phe- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin, Z-L-Phe-IBP ( <b>P1</b> ) .....	17
4.2. Boc-Ala- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin, Boc-Ala-IBP ( <b>P2</b> ).....	20
4.3. N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalamin ( <b>P3</b> ) i N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalimin ( <b>P4</b> ).....	32
4.4. Piridoksin ( <b>R1</b> ) .....	26
4.5. Piridoksal x HCl ( <b>R2</b> ).....	26
4.6. Neutralni piridoksal ( <b>R3</b> ) .....	27
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	45
7. LITERATURA .....	46
8. DODATAK .....	48
8.1. Spektri NMR, IR zračenja te spektri masa reaktanata i produkata .....	48
9. ŽIVOTOPIS .....	58

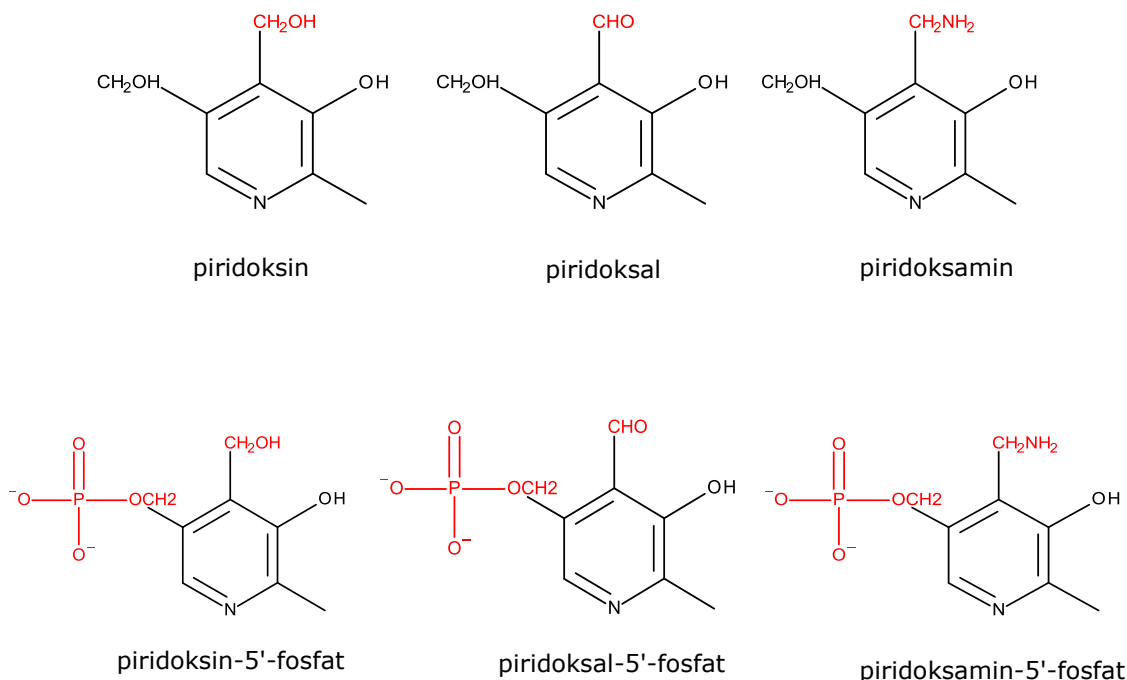
## 1. UVOD

### 1.1. Vitamin B<sub>6</sub> i njegovi derivati

Vitamini su organski spojevi raznolikih struktura i kemijskih svojstava. U organizmu su potrebni u malim količinama, ali su esencijalni za njegovo normalno funkcioniranje (rast, razvitak, reprodukcija).<sup>1</sup> U tijelu čovjeka ne mogu se sintetizirati u dovoljnim količinama pa ih je nužno unositi i hranom. Od ostalih hranjivih tvari (lipidi, ugljikohidrati, proteini) razlikuju se po tome što nemaju strukturnu ulogu niti katabolizmom daju energiju, ali sudjeluju u brojnim biokemijskim reakcijama kao koenzimi.<sup>2</sup> Nedostatak pojedinog vitamina (avitaminoza) uzrokuje specifično oboljenje, kao što su kseroftalmija ili noćno sljepilo (nedostatak vitamina A), megaloblastična anemija (nedostatak vitamina B<sub>12</sub>), skorbut (nedostatak vitamina C), rahitis (nedostatak vitamina D), krvarenje (nedostatak vitamina K) i drugi. Rizične skupine ljudi kod kojih se javlja avitaminoza općenito su pušači, konzumenti alkohola i droga, dijabetičari, trudnice, vegani, adolescenti te starije osobe.<sup>3</sup> Uzimanjem pretjerane količine pojedinih vitamina, najčešće iz grupe onih topljivih u vodi, dolazi također do poremećaja poznatog kao hipervitaminoza. Vitamini spadaju u mikronutrijente jer dnevne potrebe čovjeka za njima iznose između 1 µg i 100 mg. Klasificiraju se po svojoj biološkoj funkciji, a ne po strukturi. Poznato je 13 vitamina koji se općenito dijele u dvije skupine i to na vitamine topljive u mastima (vitamini A, D, E, K) te vitamine topljive u vodi (vitamin C i vitamini B kompleksa: tiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), niacin (B<sub>3</sub>), pantotenska kiselina (B<sub>5</sub>), piridoksin (B<sub>6</sub>), biotin (B<sub>7</sub>), folna kiselina (B<sub>9</sub>) i kobalamin (B<sub>12</sub>)).

Svaki vitamin B kompleksa ima jedinstvenu strukturu te sudjeluje u brojnim reakcijama u organizmu. Vitamini ove skupine imaju ulogu koenzima i esencijalni su u održavanju zdravlja pojedinih dijelova tijela (koža, kosa, oči, jetra, živci). Sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina pa imaju ulogu u stvaranju energije u organizmu. Ublažavaju psihijatrijske simptome kao što su depresija, anksioznost i živčanost.<sup>4</sup> Kao dijelovi enzima sudjeluju u stvaranju komponenti koje su dio imunološkog sustava pa imaju veliku ulogu u njegovom ispravnom funkcioniranju.<sup>5</sup> S obzirom na to da se zadaće vitamina B kompleksa u velikoj mjeri isprepliću i nadopunjuju, poželjno ih je unositi kao cjelinu bilo hranom ili dodacima prehrani, a ne pojedinačno.<sup>1</sup>

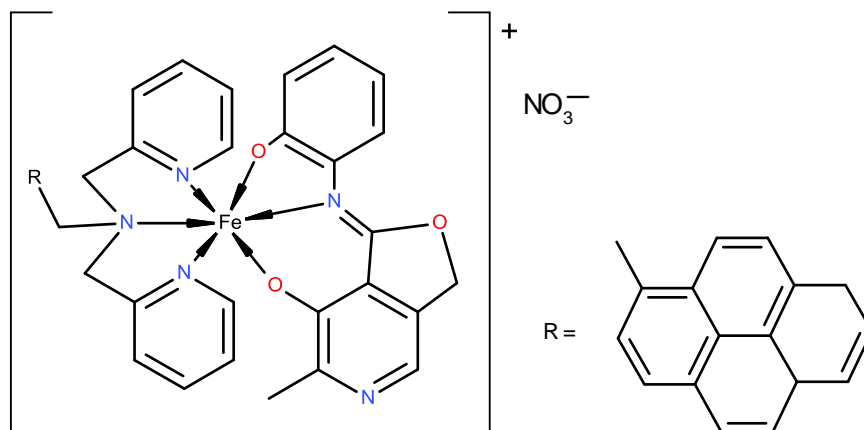
Vitamin B<sub>6</sub> esencijalni je vitamin koji se ne može pohraniti u tijelu zbog topljivosti u vodi i izlučuje se putem urina već kroz nekoliko sati od unosa u organizam. Derivati vitamina B<sub>6</sub>, piridoksin (4,5-dihidroksimetil-2-metilpiridin-3-ol), piridoksal (3-hidroksi-5-hidroksimetil-2-metilpiridin-4-karbaldehid) i piridoksamin (4-aminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridin-3-ol), međusobno se razlikuju po skupini vezanoj na položaju C-4 piridinskog prstena (Slika 1).<sup>6</sup> Fosforilacijom navedenih derivata nastaju aktivni oblici molekula, piridoksin-5'-fosfat (PNP), piridoksal-5'-fosfat (PLP) te piridoksamin-5'-fosfat (PMP). Kao koenzim, vitamin B<sub>6</sub> sudjeluje u više od šezdeset enzimskih reakcija uključenih u metabolizam aminokiselina te esencijalnih masnih kiselina.<sup>1</sup> Znanstvene studije ističu povezanost između nedostatka vitamina B<sub>6</sub> i emocionalnih bolesti kao što su depresija i šizofrenija jer je upravo B<sub>6</sub> nužan za proizvodnju serotonina i ostalih neurotransmitera u mozgu.<sup>7</sup> Također je nužan i za zdravlje krvi i krvnih žila jer sudjeluje u pretvorbi željeza u hemoglobin, u proizvodnji crvenih krvnih stanica i antitijela, a snižavanjem razine homocisteina smanjuje rizik za pojavu kardiovaskularnih bolesti.<sup>1</sup>



**Slika 1.** Derivati vitamina B<sub>6</sub>.

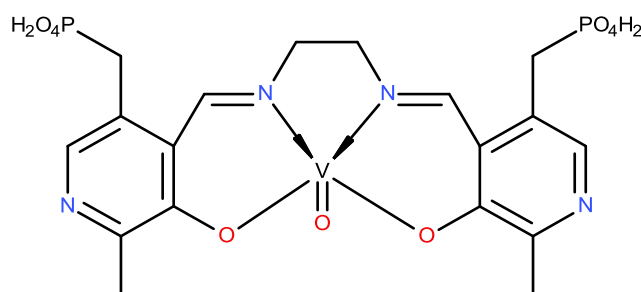


Tijekom posljednjih nekoliko godina raste zanimanje za Schiffove baze derivata vitamina B<sub>6</sub> kao što je piridoksal. Istraživanja su pokazala da takvi spojevi pokazuju selektivnost i visoku fotocitotoksičnost prema tumorskim stanicama (Slika 2).<sup>8</sup>



**Slika 2.** Koordinacijsko okruženje oko željezova(III) iona u spoju  $[Fe(pybpa)(L1)](NO_3)$ , L1 označava Schiffovu bazu piridoksina.

Također se pokazalo da Schiffove baze derivata piridoksala posjeduju terapijski učinak u smislu smanjenja rasta primarnog tumora te povećano odgađanje rasta tumora do petnaest dana na *Ehrlich ascites* tumorskim stanicama miševa (Slika 3).<sup>9</sup>

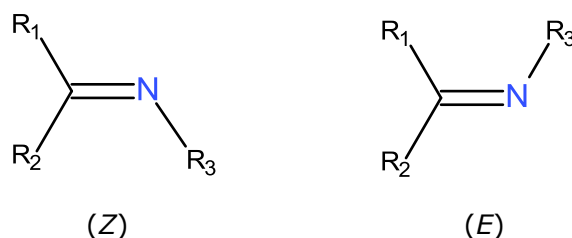


**Slika 3.** Koordinacijsko okruženje oko oksovanadijeva(IV) iona u spoju s *N,N'*-bispiridoksil-5,5'-bisfosfat etilendiiminom.

Spojevi piridoksina s aminokiselinama također su od velikog interesa za istraživanje kod organizama kod kojih je istaknuta potreba za povećanim unosom  $\alpha$ -aminokiselina. Takav se poremećaj odnosi na cirozu jetre i hepatičku encefalopatiju. Patogeneza encefalopatije objašnjava se poremećenim odnosom aminokiselina u krvi (povećanje razine aromatskih aminokiselina, a smanjenje razine aminokiselina s razgranatim lancem). Poremećaji dovode do negativne ravnoteže dušika i povećanog korištenja aminokiselina s razgranatim lancem.

## 1.2. Schiffove baze

Schiffove baze spojevi su koje karakterizira dvostruka veza između ugljikovog i dušikovog atoma ( $-\text{HC}=\text{N}-$ , azometinska skupina). Njihova opća struktura,  $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{NR}_3$ , prikazana je na slici 4. Supstituenti  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  i  $\text{R}_3$  mogu biti alkilna, arilna ili heteroarilna skupina, dok supstituent  $\text{R}_1$  još može biti i atom vodika, a  $\text{R}_3$  atom metala (Si, Al, B, Sn). Zbog dvostruke imino veze, Schiffove baze mogu nastati u obliku (*E*) i (*Z*) izomera.

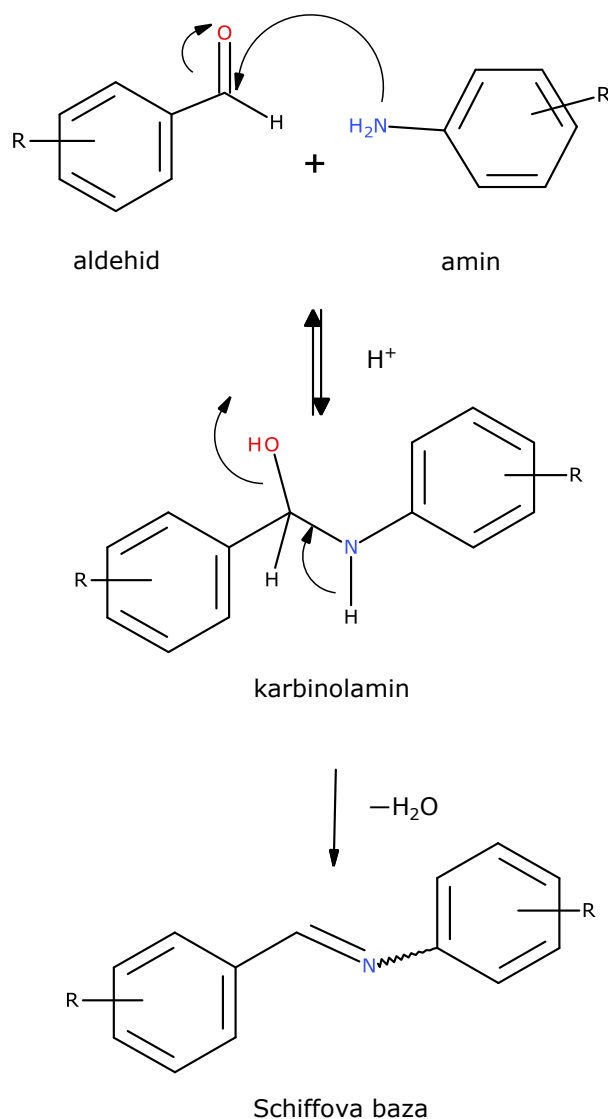


**Slika 4.** Prikaz opće strukture Schiffove baze te (*Z*) i (*E*) izomera.

Schiffove baze kondenzacijski su produkti aldehida, odnosno ketona s primarnim aminima. Baze dobivene iz aldehida nastaju lakše od onih dobivenih iz ketona zbog manje steričke zaklonjenosti molekule aldehida i općenito njihove veće reaktivnosti. Nastajanje Schiffove baze iz aldehida ili ketona reverzibilna je reakcija i općenito se odvija u kiselom ili baznom mediju pri povišenoj temperaturi. Ukoliko je kiselina jako koncentrirana može doći do protoniranja amina koji tada postaje nenukleofilan. Mehanizam nastanka Schiffove baze može

se opisati kao nukleofilna adicija primarnog amina na karbonilni ugljik aldehida, odnosno ketona, a prikazan

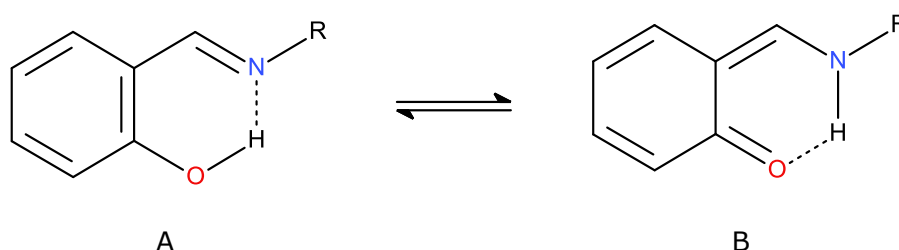
je na slici 5. U prvom dijelu reakcije amin reagira s aldehidom (ketonom) pri čemu nastaje nestabilan adicijski spoj karbinolamin. U ovom slučaju karbinolamin je alkohol koji podliježe kiselu ili bazno kataliziranoj dehidraciji pri čemu izlazi voda i nastaje Schiffova baza.<sup>10</sup>



**Slika 5.** Prikaz mehanizma nastajanja Schiffove baze.

*Ortho*-hidroksilne Schiffove baze zanimljiva su skupina spojeva koje karakterizira rezonancijom potpomognuta intramolekulska vodikova veza O—H···N te enol-imin, odnosno keto-amin tautomerija (Slika 6).<sup>11</sup> Dva tautomera, međusobno različitih svojstava, mogu prelaziti iz jednog oblika u drugi, pri čemu

je ketonski oblik obično stabilniji od enolnog. Na temelju brojnih eksperimentalnih, ali i teorijskih istraživanja *ortho*-hidroksilnih Schiffovih baza, utvrđeno je da na tautomernu ravnotežu utječe nekoliko čimbenika kao što su priroda karbonilnog prekursora (aldehida ili ketona) korištenog u sintezi Schiffove baze, priroda supstituenta aromatskog prstena, priroda aaminskog prekursora korištenog u sintezi Schiffove baze (supstituent R), ali i agregacijsko stanje, priroda otapala te temperatura sustava.<sup>12</sup>



**Slika 6.** Tautomerni oblici *ortho*-hidroksilnih Schiffovih baza:  
A) enol-iminski i B) keto-aminski.

Schiffove baze pokazuju značajnu biološku aktivnost. Do sada su poznate njihove antimalarijske, antibakterijske, antifugalne i antiviralne aktivnosti.<sup>13</sup> Posjeduju razna značajna antiupalna, antioksidacijska i antitumorska svojstva.<sup>14</sup> Imini ili spojevi s azometinskom skupinom prisutni su u različitim prirodnim, prirodno izvedenim i sintetičkim spojevima. Pokazalo se da je iminska skupina, prisutna u takvim spojevima, ključna za biološku aktivnost.<sup>13</sup> Spojevi Schiffovih baza i njihovi metalni kompleksi aktivno se istražuju jer pokazuju visoku katalitičku aktivnost. Kiralni kompleksi Schiffovih baza selektivniji su u različitim reakcijama kao što su oksidacija, hidroksilacija, aldolna kondenzacija i epoksidacija.<sup>15</sup>

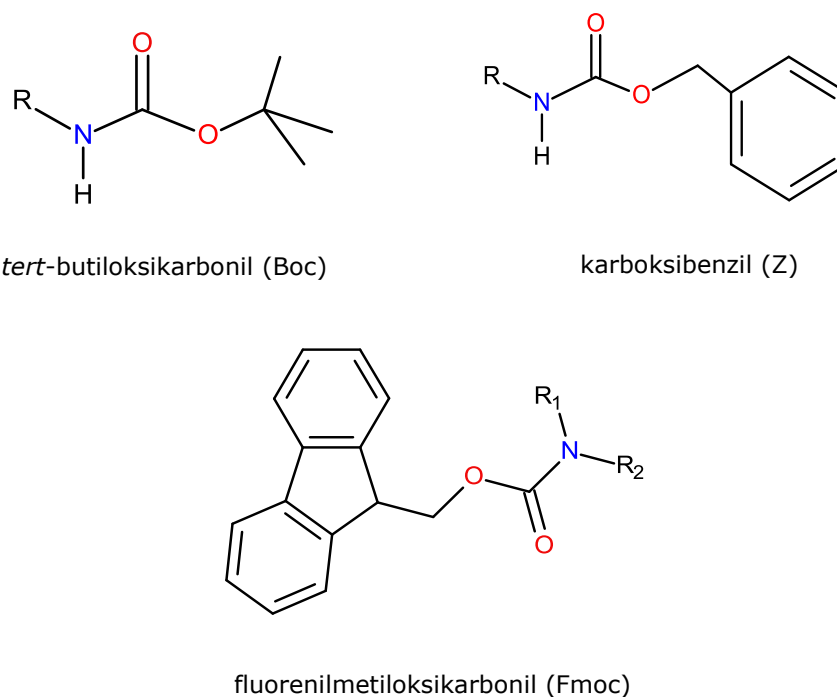
### 1.3. Zaštitne skupine kod aminokiselina i njihova uloga

U cilju dobivanja željenih struktura trebalo je osmisliti nove, uspješne sintetske putove kojima će se osigurati vezanje neke molekule na željeni položaj u drugoj molekuli. Zaštitne skupine uvode se u molekulu od interesa kemijskom modifikacijom funkcionalne skupine sa svrhom postizanja kemoselektivnosti u



kasnijem stupnju kemijske reakcije. Pri pripravi većine organskih spojeva, neki dijelovi njihovih molekula osjetljivi su na kemijske uvjete ili reagense potrebne za odvijanje reakcije. Takvi se dijelovi ili skupine moraju zaštititi, a izbor zaštitne skupine utječe na ishod reakcije. Idealna zaštitna skupina je ona koja se može lako i efikasno uvesti u reakciju, odnosno na funkcionalnu skupinu. Poželjno je da je jeftina i lako dostupna te stabilna pri različitim reakcijskim uvjetima. Također, zaštitna skupina mora imati sposobnost selektivnog uklanjanja pri specifičnim uvjetima reakcije.<sup>16</sup> Najčešće zaštitne skupine uključuju zaštitu alkohola, amina, karbonilnih skupina, karboksilnih kiselina, fosfata i terminalnih alkina.<sup>17</sup>

Aminokiseline su molekule koje sadrže amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ) i karboksilnu skupinu ( $-\text{COOH}$ ) te bočni lanac koji se naziva ostatak i obilježava se slovom *R*. Pri radu s aminokiselinama, zaštita aminske skupine bitan je dio sintetske organske kemije, kao i peptidne sinteze. Amini su nukleofilni i bazični po svojoj prirodi pa ih je ponekad tijekom kemijske reakcije potrebno zaštititi. Nakon završetka sinteze i uklanjanja zaštitne skupine amin se vraća u prvotno stanje. Najčešće korištene zaštite amina *tert*-butiloksikarbonil (Boc), karboksibenzil (Cbz, Cbo, Z) i fluorenilmetiloksikarbonil (Fmoc) prikazane su na slici 7.



**Slika 7.** Zaštitne skupine amina.

*Tert*-butiloksikarbonil (Boc) najčešće je korištena zaštitna skupina kod zaštite  $\alpha$ -aminokiselina.<sup>18</sup> Razlikujemo nekoliko načina dobivanja Boc zaštićenih derivata. Komerцијално dostupan Boc—ON reagira s aminima, a u prisutnosti druge baze (npr. trietilamina,  $N(CH_2CH_3)_3$ ) nastaje *N*-Boc derivat.<sup>19</sup> Također, reakcijom s di-*tert*-butildikarbonatom ( $Boc_2O$ ) pri baznim uvjetima nastaje Boc zaštićeni amin.<sup>20</sup> Ova zaštitna skupina osjetljiva je na jaku bezvodnu kiselinu i trimetil sililtriflat ( $C_4H_9F_3O_3SSi$ ). Stabilna je na nukleofile i organometale, uključujući i organolitijeve reagense, iako Grignardov reagens može reagirati nukleofilnom acilnom adicijom. Također, stabilna je pri hidrogenaciji (osim pri kiselim uvjetima), na hidride, oksidirajuće agense, vodene kiseline i blage Lewisove kiseline.<sup>21</sup> Boc zaštitne skupine kod aminokiselina uklanjaju se jakim kiselinama kao što je trifluoroctena kiselina (TFA) ili hidrokloridna kiselina (HCl), a slobodni amino kraj se neutralizira upotrebom terciarnog amina.<sup>22,23</sup>

Karboksibenzil (Cbz, Cbo, Z) je karbamat koji se također, uz Boc zaštitnu skupinu, često koristi kao aminska zaštitna skupina u organskoj sintezi. Karboksibenzilna zaštitna skupina koristi se u sintezi peptida, a uvodi se reakcijom aminske funkcionalne skupine s benzil kloroformatom ( $C_8H_7ClO_2$ ) u slabo baznim uvjetima. Zaštićeni amin se može ukloniti katalitičkom hidrogenacijom ili obradom s bromovodikom (HBr), dajući terminalnu karbaminsku kiselinu koja se zatim lako dekarboksilizira, pri čemu nastaje slobodni amin.<sup>24</sup>

Fluorenilmetiloksikarbonil (Fmoc) je jedna od najprikladnijih zaštitnih skupina u sintezi većih peptida. Uvodi se reakcijom amina i 9-fluorenilmetil kloroformata. Ovo je prva zaštitna skupina koja se pokazala stabilnom prema kiselim reagensima, no vrlo nestabilnom pri blagim baznim i nehidrolitičkim uvjetima. Stoga, njeno uklanjanje uključuje tekući amonijak, piperidin ili etanolamin.<sup>25</sup>

#### **1.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)**

Spektroskopija NMR (*engl.* Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) trenutno je jedna od vodećih analitičkih metoda koja se koristi pri identifikaciji, strukturnoj i konformacijskoj analizi organskih i anorganskih molekula te bioloških molekula.



Svaka jezgra atoma posjeduje kvantni broj nuklearnog spina,  $I$ , i nuklearni magnetski spinski kvantni broj,  $m_I$ . Magnetski spinski kvantni broj govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetskom polju, a broj mogućih orijentacija je  $2I + 1$ . Kvantni broj  $I$  u korelaciji je sa spinskom kutnom količinom gibanja ( $P$ ),

$$P = \sqrt{I(I + 1)} \hbar \quad (1-1)$$

a s kvantnim brojem  $m_I$  povezana je  $z$  komponenta vektora kutne količine gibanja. Malim slovom  $h$  označena je Planckova konstanta ( $6,6256 \times 10^{-34}$  Js), koja podijeljena s  $2\pi$  daje novu konstantu  $\hbar$ :

$$P_z = m_I \times \hbar \quad (1-2)$$

Vrtnja naboja inducira magnetsko polje, odnosno magnetski moment. Magnetski moment jezgre,  $\mu$ , može se pisati kao:

$$\mu = \gamma \times P \quad (1-3)$$

pri čemu  $\gamma$  opisuje žiromagnetski omjer koji je karakterističan za svaku jezgru. Magnetski moment jezgre u interakciji je s magnetskim poljem  $B$ , a energija njihove interakcije iznosi:

$$E = -\mu \times B \quad (1-4)$$

Fenomen NMR moguć je samo ako broj protona i neutrona u jezgri atoma nije paran, jer je tada ukupan spinski kvantni broj jednak nuli,  $I = 0$ . Jezgre kod kojih je  $I > 0$  ponašaju se kao mali magneti. Da bi se jezgre pobudile, prešle iz nižeg u više energetske stanje, mora se primijeniti radiofrekvencijsko zračenje čija je energija jednaka frekvenciji precesije jezgre. Stoga, spektroskopija NMR uključuje prijelaz jezgara iz jednog spinskog stanja u drugo, pri čemu dolazi do apsorpcije energije radiovalnog zračenja. U odsutnosti magnetskog polja pri sobnoj temperaturi, spinska stanja su degradirana. Djelovanjem magnetskog polja na jezgru, spinska stanja gube svoju degradaciju, pa se pojavljuje više odvojenih energetskih razina, zavisno o kvantnom broju spina  $I$ . Prijelaz između različitih energijskih razina moguć je apsorpcijom elektromagnetskog zračenja, ako je ispunjen Bohrov uvjet

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (1-5)$$

Kada energija koja djeluje na pojedinu jezgru zadovolji vrijednost potrebnu za rezonanciju, ona se apsorbira. Proces apsorpcije elektromagnetskog zračenja naziva se magnetska rezonancija.<sup>26</sup>

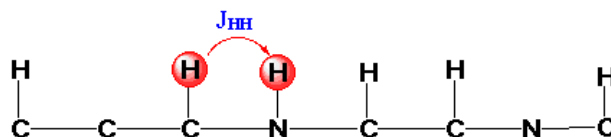
Spektre NMR karakteriziraju sljedeći parametri: kemijski pomak, konstanta sprege, relativni intenzitet signala povezan s vremenom longitudinalne relaksacije te širina linije povezana s vremenom transversalne relaksacije. Kemijski pomak uzrokuju magnetna polja koja stvaraju elektroni koji se nalaze u blizini jezgre. Ta mala magnetna polja obično su suprotnog predznaka vanjskom magnetnom polju, pa su jezgre izložene manjem rezultirajućem polju od vanjskog, odnosno zasjenjene su. Jačina rezultirajućeg polja direktno je proporcionalna vanjskom polju. Parametar kemijskog pomaka ( $\delta$  / ppm) pokazuje relativni pomak u odnosu na neki standard. Spin-spin sprege može se objasniti interakcijom magnetnog momenta jezgre s magnetnim momentnom susjedne jezgre preko veznih elektrona, što dovodi do cijepanja energetske razine. Sprezanje dvije jezgre opisuje se konstantom sprege  $J$  (Hz) koja se ne mijenja u ovisnosti o jačini primijenjenog vanjskog magnetnog polja. Prestankom djelovanja radiofrekvencijskog zračenja, spinovi se vraćaju u osnovno stanje. To se može dogoditi na dva moguća načina. Longitudinalnim otpuštanjem,  $T_1$ , do kojeg dolazi zbog interakcije jezgre s okolinom, odnosno energija prelaska iz višeg u niže stanje pretvara se u terminalne vibracije ili rotacije okoline. Ili transversalnim otpuštanjem,  $T_2$ , zbog interakcije između susjednih jezgri, dolazi do izmjene kvantnih stanja između te dvije jezgre.

Najčešće korištene jednodimenzijske tehnike (1D) spektroskopije NMR su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  APT.  $^1\text{H}$  NMR tehnikom detektiraju se signali kemijski neekvivalentnih protona u spoju. Broj protona proporcionalan je omjeru površine ispod signala (integral). Ovaj spektar daje prvi uvid u strukturu spoja na temelju očitanih kemijskih pomaka i konstanti sprege spin-spin. Primjenom tehnike APT (*engl.* Attached Proton Test) moguće je razlikovati ugljikove atome prema multiplicitetu (C, CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) te odrediti broj protona direktno vezanih za pojedini atom ugljika.

Kod molekula veće molekulske mase, jednodimenzijski spektri su najčešće presloženi za određivanje njihove strukture s velikom sigurnošću pa se uz njih primjenjuju i dvodimenzijske (2D) tehnike spektroskopije NMR. Takve tehnike temelje se na sprezanju između nuklearnih spinova koje može biti skalarno (kroz kemijske veze) i dipolno (kroz prostor). 2D spektroskopija NMR dijeli se na tri

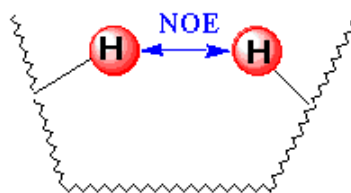
temeljne kategorije, a to su spektroskopija korelacije kemijskih pomaka, spektroskopija razdvajanja sprege spin-spin te spektroskopija višestrukih kvantnih prijelaza. Sprega spin-spin između istovrsnih jezgri (npr. protona) naziva se homonuklearna sprega, dok se sprega između različitih jezgara (npr. između protona i  $^{13}\text{C}$ ) naziva heteronuklearna sprega. Od homonuklearnih 2D eksperimenata NMR široku primjenu u strukturnoj determinaciji molekula imaju  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  COSY (*engl.* Correlation Spectroscopy),  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  NOESY (*engl.* Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) i  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  ROESY (*engl.* Rotating Frame Overhauser Enhancement).<sup>26</sup>

U eksperimentu COSY magnetizacija se prenosi skalarnim sprežanjem. Signali protona koji su povezani preko dvije (geminalna sprega,  $^2J$ ) ili tri kemijske veze (vicinalna sprega,  $^3J$ ) vidljivi su u ovoj vrsti spektra (Slika 8). Protoni koji su međusobno udaljeni za više od tri kemijske veze ne daju križne signale jer je sprega  $^4J$  jako mala, blizu nuli.



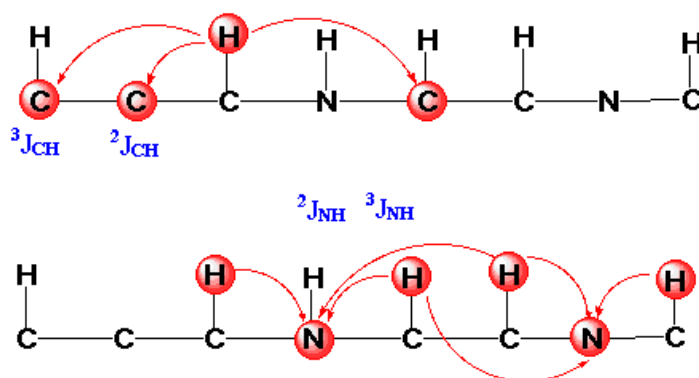
**Slika 8.** COSY tehnika NMR.

NOESY eksperiment od iznimne je važnosti pri određivanju trodimenzijske strukture molekula metodom NMR. Križni signali dobiveni tehnikom NOESY rezultat su  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  dipol-dipol interakcije. Promjena intenziteta signala uslijed prijenosa magnetizacije dipolnom spregom naziva se *nuklearni Overhauserov efekt* (NOE) te daje informaciju o prostornoj povezanosti  $^1\text{H}$  jezgri. Intenzitet NOE je proporcionalan vrijednosti  $1/r^6$ , gdje je  $r$  udaljenost između protona, ali se signal dobije samo ako je njihova udaljenost manja od 5 Å (Slika 9). NOE može biti pozitivan, negativan ili imati vrijednost nula što ovisi o molekulskoj masi molekule. Kod molekule srednje veličine (molekulska masa oko 1000 Da) vrijednost NOE je vrlo mala ili nula, pa se tehnikom NOESY ne dobiva dovoljno podataka o prostornim odnosima H-atoma. U tom slučaju primjenjuje se tehnika ROESY, kod koje se križne relaksacije izvode u rotirajućem sustavu uz tzv. zaključavanje spinova ("*spin-lock*") pa NOE u transverzalnoj ravnini (ROE) uvijek ima pozitivnu vrijednost.<sup>27</sup>



**Slika 9.** NOE efekt.

Spektroskopija višestrukih kvantnih prijelaza proučava nuklearne prijelaze koji su zabranjeni pravilom  $\Delta m = \pm 1$ . Višestruki kvantni prijelazi za  $\Delta m > 1$  mogu postojati samo u sustavima koji imaju više od dvije energetske razine, za jezgre s  $I > 1/2$  ili za dvije ili više jezgre s  $I = 1/2$  koje su u dipolnoj ili skalarnoj sprezi. Takvi kvantni prijelazi ne mogu se detektirati uobičajenom spektroskopijom NMR koja je slabe snage. Kod heteronuklearnih 2D spektara proučava se korelacija između dva heteroatoma, npr.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  ili  $^1\text{H}$  i  $^{15}\text{N}$  itd. Dva najvažnija takva eksperimenta NMR su HMQC (*engl.* Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) i HMBC (*engl.* Heteronuclear Multiple Bond Correlation). HMQC je tehnika u kojoj se  $^{13}\text{C}$  jezgre određuju preko detekcije  $^1\text{H}$  jezgre pri čemu se  $^{13}\text{C}$  jezgre rasprežu od protona, odnosno svaki signal u HMQC spektru predstavlja proton koji je direktno vezan na heteroatom. U HMQC spektru kemijski pomaci  $^1\text{H}$  koreliraju s kemijskim pomacima  $^{13}\text{C}$  putem C—H sprege kroz jednu vezu. HMBC spektar pokazuje povezanost određenog protona s heteroatomom kroz dvije ili više veza (Slika 10).<sup>28</sup>



**Slika 10.** HMBC tehnika NMR.

## 2. CILJ RADA

Istraživanja u ovom radu usmjerena su na pripravu i karakterizaciju derivata vitamina B<sub>6</sub> i to piridoksina s aminokiselinama sa zaštićenim amino krajem (Boc-alanin i Z-fenilalanin) te neutralnog piridoksala s primarnim aminima u svrhu dobivanja novih spojeva s potencijalno poboljšanim biološkim svojstvima.

Izolirani spojevi okarakterizirani su na temelju rezultata dobivenih 1D i 2D spektroskopijom NMR u otopini, spektrometrijom masa te spektroskopijom IR u čvrstom stanju. Od jednodimenzijskih tehnika NMR korištene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C APT, a od dvodimenzijskih <sup>1</sup>H—<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H—<sup>1</sup>H NOESY, <sup>1</sup>H—<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H—<sup>13</sup>C HMBC i <sup>1</sup>H—<sup>15</sup>N HMBC. Od tehnika ionizacije u spektrometriji masa primijenjena je ionizacija raspršenim elektronima (ESI-MS).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije

Potrebne kemikalije nabavljene su od različitih proizvođača (Sigma-Aldrich Co., Carlo Erba, J.T. Baker, VWR Chemicals, Kemika, Euriso-Top), a u sintezi spojeva korištene su bez dodatnog pročišćavanja. Čistoća svih spojeva veća je od 97 %, a korištena otapala su *p.a. (pro analysi)* čistoće.

#### 3.2. Priprava derivata vitamina B<sub>6</sub>

##### 3.2.1. Z-L-Phe- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin (**P1**)

U 30 mL otopine priređene iz Z-zaštićenog L-fenilalanina (2 mmol) doda se 2 mmol dicikloheksilkarbodiimida (DCC) i 2 mmol  $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksina (IBP). Reakcijska smjesa miješa se pri sobnoj temperaturi oko 2 sata. Dobiveni kristali dicikloheksiluree (DCU) profiltriraju se, a matičnica upari uz sniženi tlak. Sirovi produkt prekrizalizira se iz etilacetata.

##### 3.2.2. Boc-Ala- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin (**P2**)

U 30 ml otopine priređene iz Boc-zaštićenog alanina (2 mmol) doda se 2 mmol dicikloheksilkarbodiimida (DCC) i 2 mmol  $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksina (IBP). Reakcijska smjesa miješa se pri sobnoj temperaturi oko 2 sata. Nastali kristali dicikloheksiluree (DCU) profiltriraju se, a matičnica upari uz sniženi tlak. Sirovi produkt prekrizalizira se iz etilacetata.

##### 3.2.3. N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalamin (**P3**) i

##### N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalimin (**P4**)

Acetonitrilnoj otopini (20 mL) piridoksal hidroklorida (1,2 mmol) doda se, uz miješanje, NaOH (1,6 mmol), a potom i 2-amin-4-klorfenol (1 mmol). Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj miješalici uz vodeno hladilo pri temperaturi od približno 80 °C. Nakon približno 2 sata, otopina se ostavi hladiti pri sobnoj temperaturi. Nastali talog odvojen je od matičnice filtracijom uz sniženi tlak. Dobiveni produkt osušen je u eksikatoru iznad silikagela.

### 3.3. Spektroskopija NMR u otopini

Jednodimenzijски i dvodimenzijски spektri NMR snimljeni su pomoću instrumenta visokog razlučivanja Bruker AV600 u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković. Jakost magneta korištenog instrumenta iznosi 14,1 T. Pri snimanju korištena je 5 mm proba BBO BB-1H Z-GRD Z8478/53. Uzorci su otopljeni u deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO- $d_6$ ) s 0,05 % (V/V) tetrametilsilanom (TMS) i snimljeni pri temperaturi od 25 °C. Za određivanje strukture priređenih spojeva u otopini korištene su 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT) i 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  HMBC) tehnike NMR.

Spektri  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  APT snimljeni su pri frekvenciji od 600,130 MHz, odnosno 150,903 MHz. Kemijski pomaci signala u spektru ( $\delta$  / ppm) određeni su prema pomaku signala otapala DMSO- $d_6$  i to za  $^1\text{H}$   $\delta = 2,51$  ppm, a za  $^{13}\text{C}$   $\delta = 39,51$  ppm. Za snimanje spektara  $^1\text{H}$  NMR korištena je spektralna širina od 20 ppm (12000 Hz) uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s, te s vremenom akvizicije od 1,36 s. Broj pulseva po spektru bio je u rasponu od 16 do 64. Digitalno razlučivanje iznosilo je 0,37 Hz po točki. Spektri  $^{13}\text{C}$  snimljeni su uz spektralnu širinu od 260 ppm (39370 Hz), relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s, te s vremenom akvizicije od 0,832 s. Po pojedinačnom spektru primijenjeno je 100 do 600 snimaka. Digitalno razlučivanje iznosilo je 0,60 Hz po točki.

Spektri  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY snimljeni su uporabom 2048 točaka u dimenziji  $f_2$  i 512 inkremenata u dimenziji  $f_1$ . Svaki primijenjeni inkrement sadrži 2 snimke. Spektralna širina snimanja iznosi 16 ppm (9615 Hz) uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s. Digitalno razlučivanje dobiveno u ovim eksperimentima iznosilo je oko 4,69 Hz po točki u dimenziji  $f_2$ , odnosno 28,58 Hz po točki u dimenziji  $f_1$ .

Za snimanje spektara  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC korišteno je 2048 točaka u dimenziji  $f_2$  i 256 inkremenata u dimenziji  $f_1$ . Za svaki inkrement primijenjeno je 4 do 8 pulseva uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s. Korištena spektralna širina iznosila je 9615 Hz ( $f_2$ ) i 36240 Hz ( $f_1$ ), a digitalno razlučivanje 4,69 ( $f_2$ ) i 141,48 Hz ( $f_1$ ) po točki. U eksperimentima  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC korišteno je 2048 točaka u dimenziji  $f_2$  i 256 inkremenata u dimenziji  $f_1$ . Za svaki inkrement zadano je 16 pulseva uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,5 s. Spektralna širina iznosila je 9615,38 Hz ( $f_2$ ) i 36600 Hz ( $f_1$ ), a digitalno

razlučivanje 4,69, odnosno 142,56 Hz po jedinici mjerenja u dimenziji  $f_2$ ,  
odnosno  $f_1$ . Kod svih spektara HMBC, korišteno



je dodatno vrijeme opuštanja od 0,065 s kako bi se u spektru vidjele i C–H i N–H sprege kroz više veza (2–4). Slike snimljenih spektara sintetiziranih kompleksnih spojeva priložene su u *Rezultatima*.

### **3.4. Spektrometrija masa**

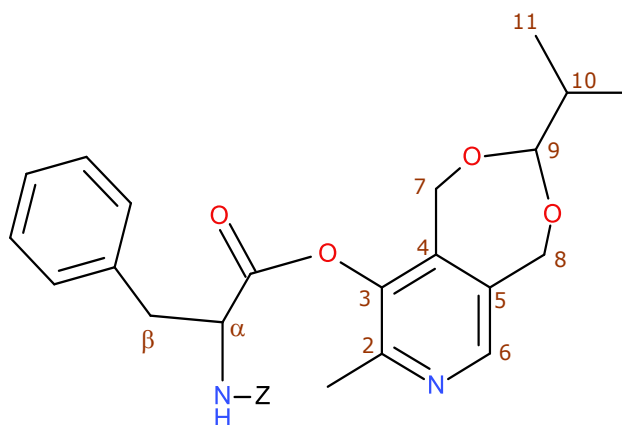
Spektri masa pripremljenih spojeva snimljeni su u Laboratoriju za biomimetičku kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom Agilent 6420. Uzorci su otopljeni u metanolu, a kao ionizator korištena je ionizacija raspršenim elektronima (ESI). Primijenjeni napon kolizijske ćelije iznosio je 135,0 V. Spektri su snimljeni u pozitivnom i negativnom načinu rada (ESI<sup>+</sup>-MS i ESI<sup>-</sup>-MS). Rezultati su prikazani kao ovisnost relativnog intenziteta signala, izražena u postocima, i omjera mase/naboja ( $m/z$ ). Slike snimljenih spektara sintetiziranih kompleksnih spojeva priložene su u *Dodatku*.

### **3.5. Spektroskopija infracrvenog zračenja**

Infracrveni spektri spojeva snimljeni su pomoću FTIR/ATR Perkin Elmer UATR spektrofotometra na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u području od 4000 do 350 cm<sup>-1</sup>. Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost transmitancije ( $T$ ) izražene u postocima o valnom broju ( $\tilde{\nu}$ ) izraženom u cm<sup>-1</sup>. Slike snimljenih spektara sintetiziranih kompleksnih spojeva priložene su u *Dodatku*.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Z-L-Phe- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin, Z-L-Phe-IBP (P1)



**P1**

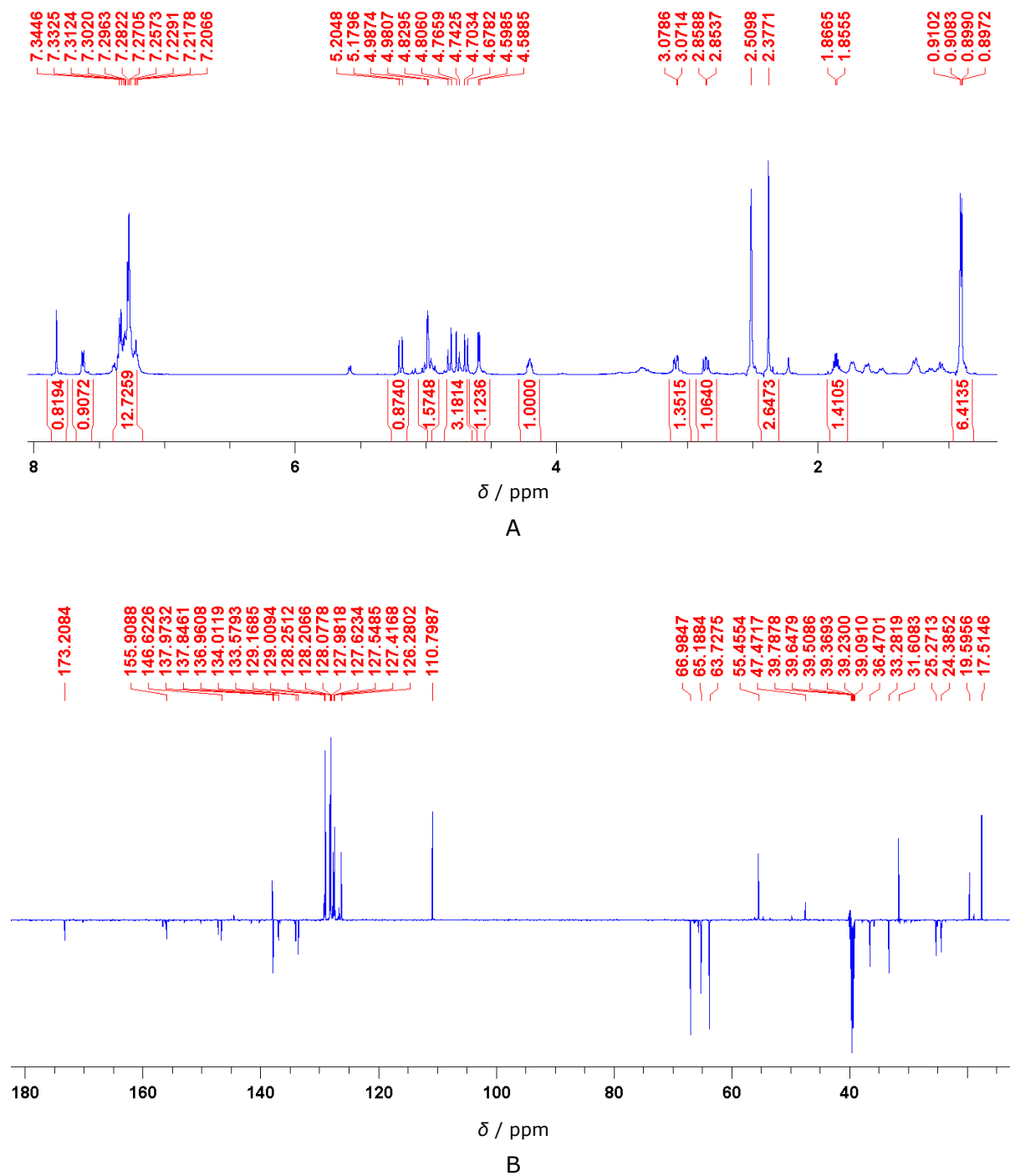
Iskorištenje: 0,79 g (80,2 %).

$^1\text{H}$  NMR (600,130 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  7,83 (1H, s, H-6), 7,62 (1H, d,  $J = 8,42$  Hz, NH), 7,16 – 7,42 (10H, m, H-Ar), 5,18 (1H, d,  $J = 15,59$  Hz, H-7b), 4,98 (2H, dd,  $J = 15,66$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4,81 (1H, d,  $J = 14,16$  Hz, H-8a), 4,74 (1H, d,  $J = 14,16$  Hz, H-8b), 4,68 (1H, d,  $J = 15,59$  Hz, H-7a), 4,59 (1H, d,  $J = 6,20$  Hz, H-9), 4,21 (1H, m, H- $\alpha$ ), 3,08 (1H, dd,  $J = 13,63$  Hz,  $J = 4,43$  Hz, H- $\beta_2$ ), 2,85 (1H, dd,  $J = 13,63$  Hz,  $J = 10,43$  Hz, H- $\beta_1$ ), 2,37 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-2}$ ), 1,86 (1H, hept,  $J = 6,84$  Hz, H-10), 0,90 (6H, dd,  $J = 6,84$  Hz,  $J = 1,11$  Hz, H-11) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  173,4 (1C,  $\text{COO-Phe}$ ), 155,9 (1C,  $\text{COO-Z}$ ), 147,1 (1C, C-3), 146,5 (1C, C-2), 137,9 (1C, C-6), 137,9 – 126,3 (8C, C-Ar), 134,0 (1C, C-5), 133,6 (1C, C-4), 110,6 (1C, C-9), 67,2 (1C, C-8), 65,6 (1C,  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 63,8 (1C, C-7), 55,7 (1C, C- $\alpha$ ), 36,7 (1C, C- $\beta$ ), 31,6 (1C, C-10), 19,9 (1C,  $\text{CH}_3\text{-2}$ ), 17,6 (2C, C-11) ppm.

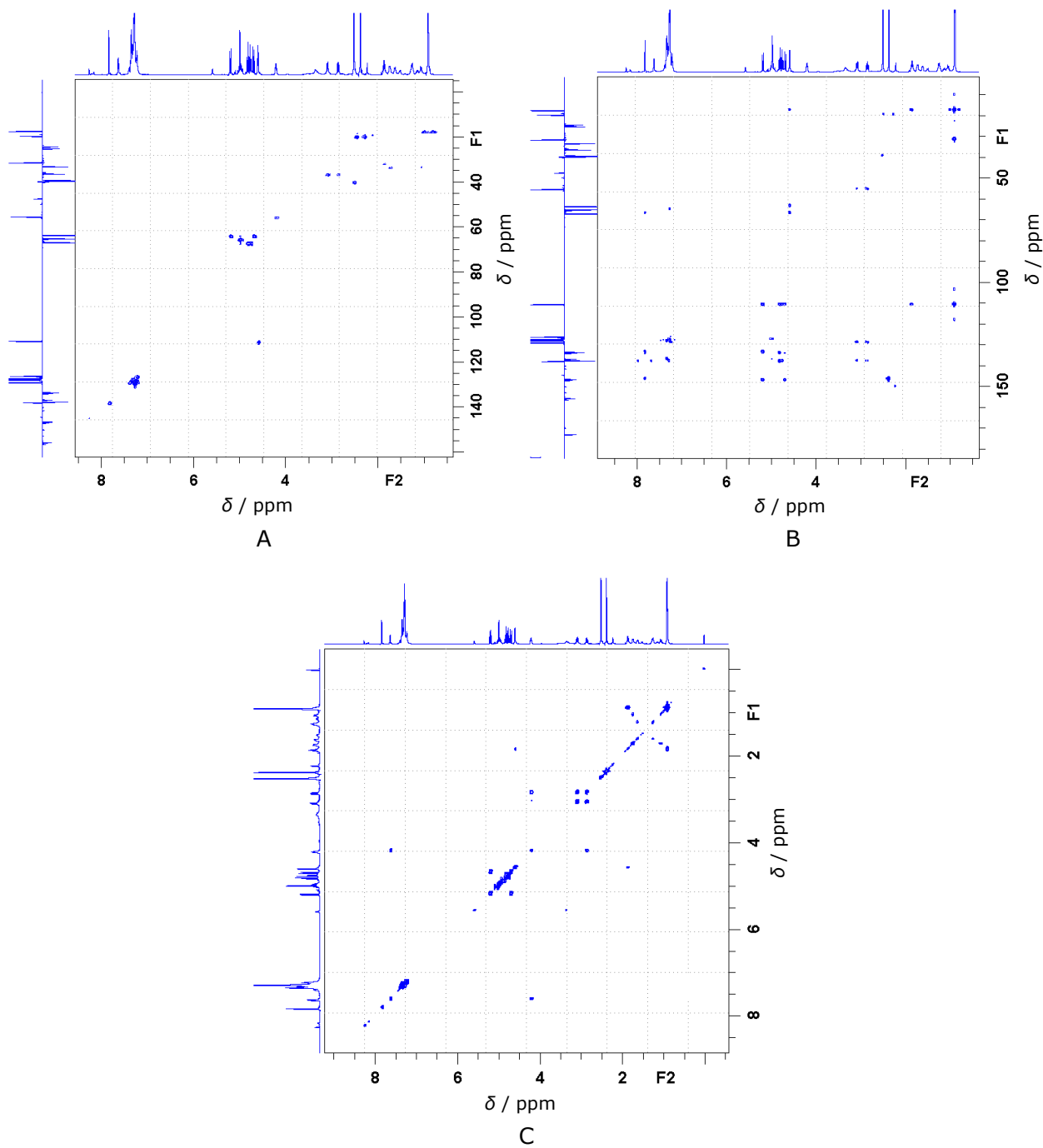
FT-IR ( $\tilde{\nu}$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3324 (m), 3032 (w), 2928 (m), 2851 (m), 1698 (s), 1534 (s), 1453 (w-m), 1406 (m), 1257 (s), 1133 (m), 1047 (m), 944 (w), 747 (m), 697 (m), 567 (w), 488 (w).

ESI $^+$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 224,1 [ $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ ] $^+$ .

ESI $^-$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 298,0 [ $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{NO}_4$ ] $^-$ .

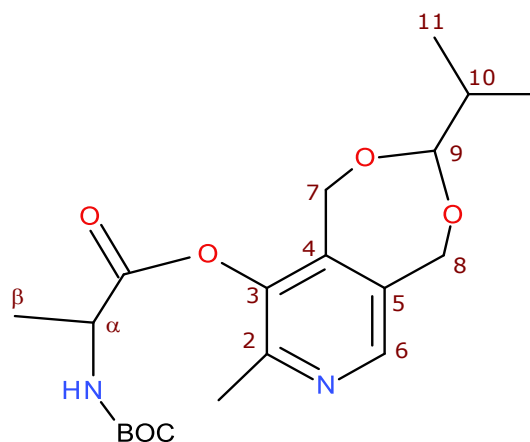


**Slika 11.** A)  $^1\text{H}$  i B)  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **P1**.



**Slika 12.** A)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC i C)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektar spoja **P1**.

#### 4.2. Boc-Ala- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin, Boc-Ala-IBP (P2)



**P2**

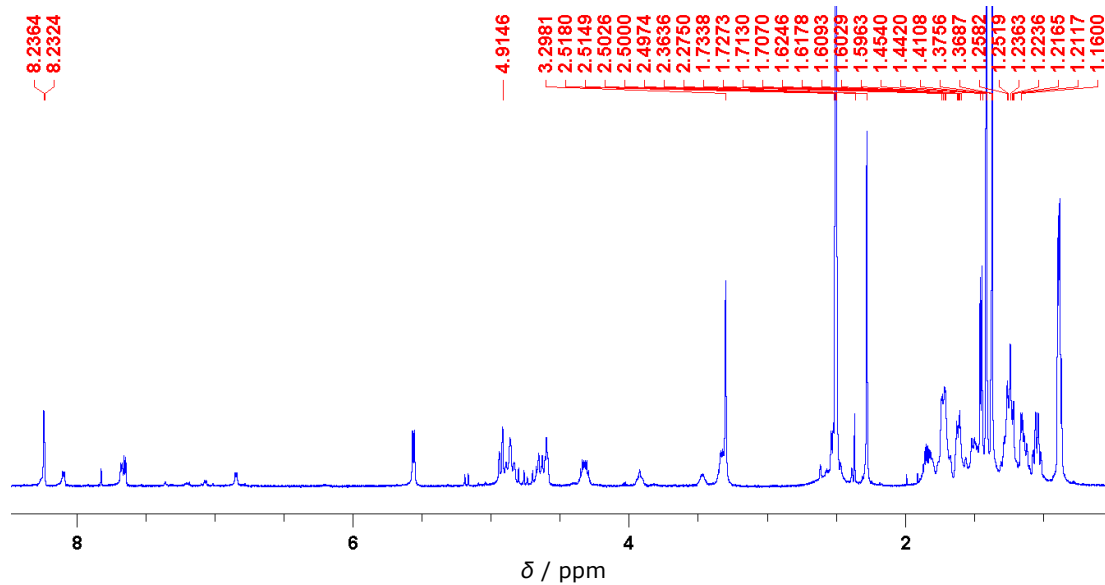
Iskorištenje: 0,52 g (65,91 %).

$^1\text{H}$  NMR (600,130 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  8,26 (1H, s, H-6), 7,68 (1H, d,  $J$  = 7,34 Hz, NH), 5,18 (1H, d,  $J$  = 14,96 Hz, H-7b), 4,93 (1H, d,  $J$  = 14,34 Hz, H-8b), 4,84 (1H, d,  $J$  = 14,34 Hz, H-8a), 4,68 (1H, d,  $J$  = 14,96 Hz, H-7a), 4,59 (1H, d,  $J$  = 6,20 Hz, H-9), 4,32 (1H, m, H- $\alpha$ ), 2,27 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -2), 1,86 (1H, hept,  $J$  = 6,86 Hz, H-10), 1,45 (3H, d,  $J$  = 7,27 Hz,  $\text{CH}_3$ - $\beta$ ), 1,41 (9H, s,  $\text{CH}_3$ -Boc), 0,90 (6H, dd,  $J$  = 6,86 Hz, H-11) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  170,4 (1C,  $\text{COO-Ala}$ ), 155,2 (1C,  $\text{COO-Boc}$ ), 149,6 (1C, C-3), 146,5 (1C, C-2), 142,3 (1C, C-6), 140,3 (1C, C-4), 134,2 (1C, C-5), 110,7 (1C, C-9), 78,1 (1C, C-Boc), 66,4 (1C, C-8), 63,8 (1C, C-7), 48,1 (1C, C- $\alpha$ ), 31,6 (1C, C-10), 28,2 (1C,  $\text{CH}_3$ -Boc), 18,5 (1C,  $\text{CH}_3$ -2), 17,4 (2C, C-11), 16,98 (1C,  $\text{CH}_3$ - $\beta$ ) ppm.

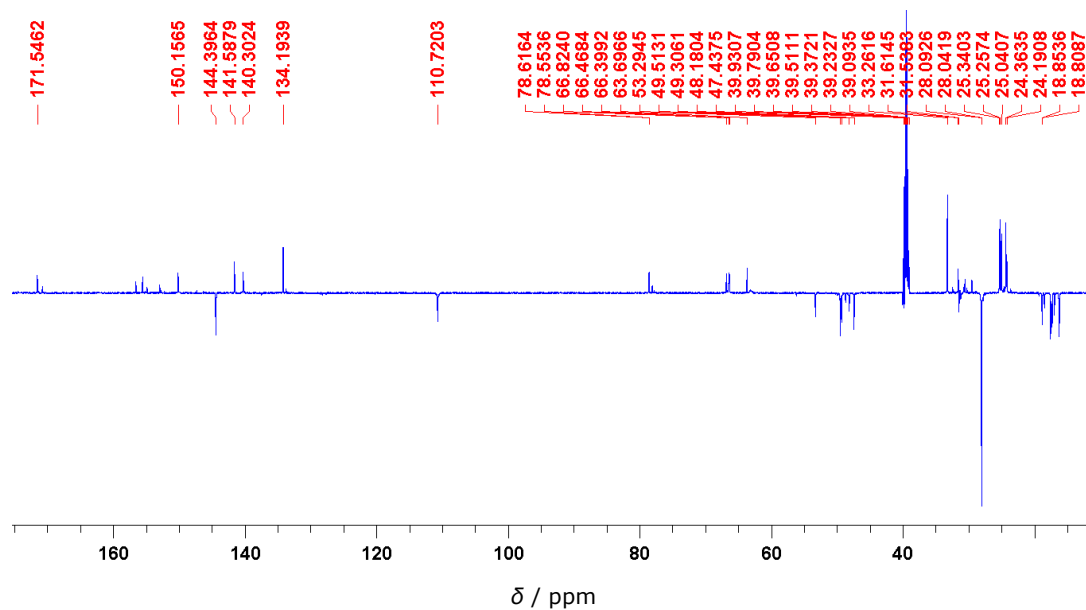
FT-IR ( $\tilde{\nu}$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3324 (m), 2929 (s), 2851 (m), 1755 (m), 1675 (s), 1626 (m), 1575 (m), 1524 (s), 1447 (m), 1368 (m), 1269 (m), 1159 (s), 1069 (m), 1005 (w-m), 945 (w), 892 (w), 851 (w), 788 (w), 641 (w-m), 423 (w).

ESI $^+$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 224,1 [ $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ ] $^+$ .

ESI $^-$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 114,0 [ $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ ] $^-$ .

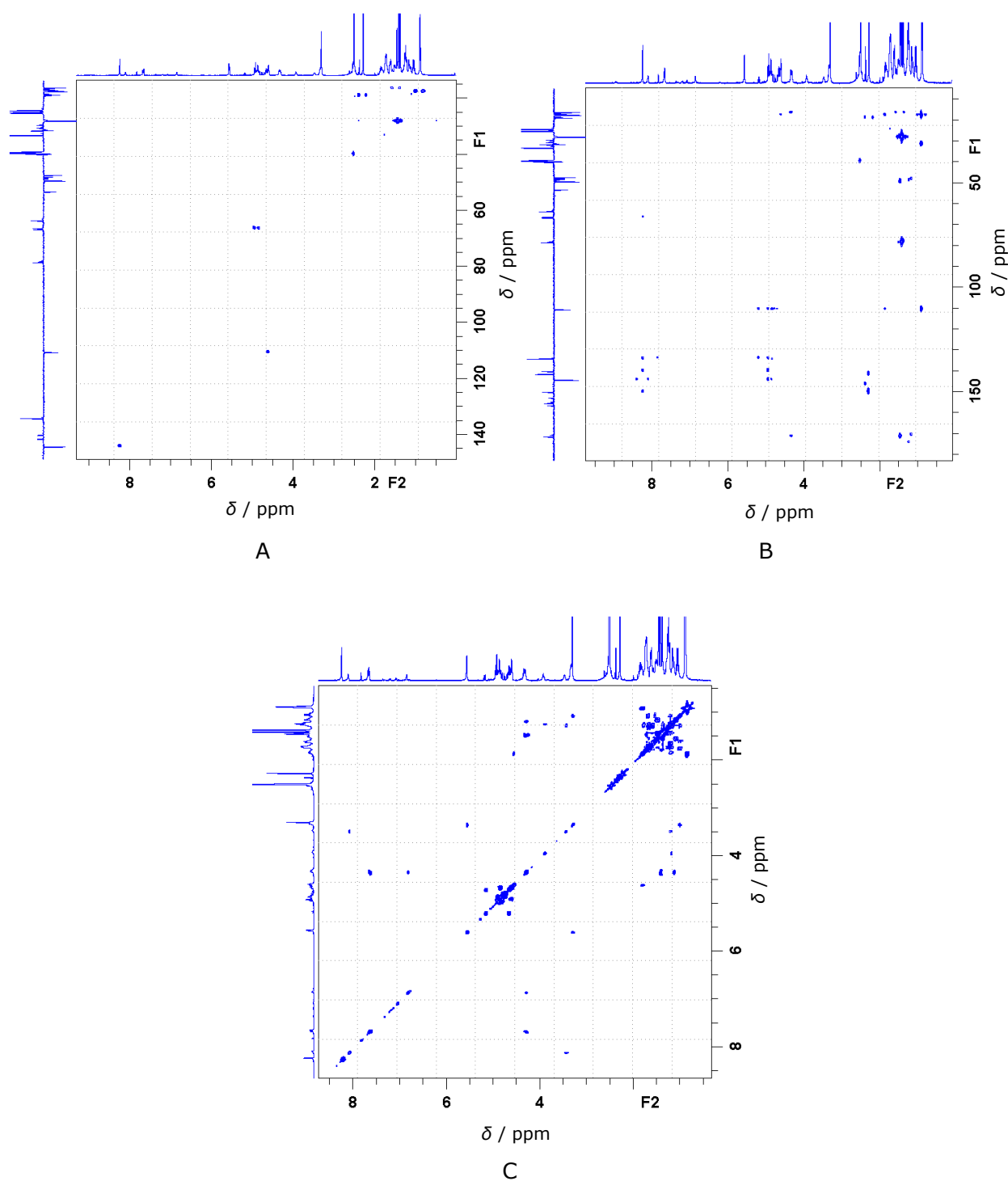


A



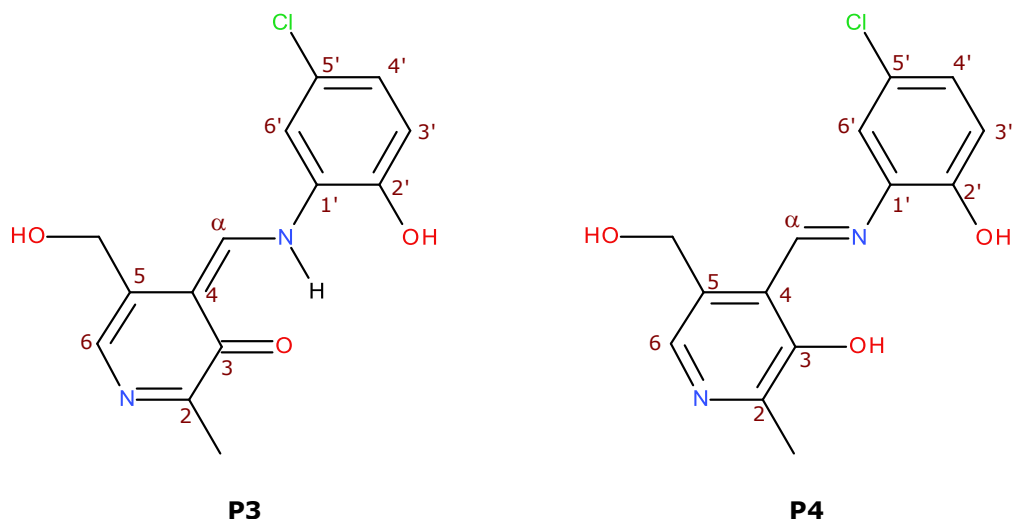
B

**Slika 13.** A)  $^1\text{H}$  i B)  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **P2**.



**Slika 14.** A)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC i C)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektar spoja **P2**.

#### 4.3. *N*-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalamin, (P3) i *N*-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalimin, (P4)



Iskorištenje: 1,55 g (91,2 %).

**P3:**  $^1\text{H}$  NMR (600, 130 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  9,98 (1H, s, OH-2'), 7,95 (1H, s, H-6), 6,86 (1H, d,  $J$  = 2,50 Hz, H-6'), 6,72 (1H, d,  $J$  = 8,36 Hz, H-3'), 6,58 (1H, s, H-4'), 6,58 (1H, s, H- $\alpha$ ), 5,41 (1H, s, OH-5), 5,38 (1H, d, NH), 5,02 (1H, d,  $J$  = 12,28 Hz,  $\text{CH}_2$ -b), 4,92 (1H, d,  $J$  = 12,74 Hz,  $\text{CH}_2$ -a), 2,39 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  146,0 (1C, C-3), 145,5 (1C, C-2), 143,7 (1C, C-2'), 136,1 (1C, C-1'), 135,7 (1C, C-5), 132,7 (1C, C-6), 131,8 (1C, C-4), 122,9 (1C, C-5'), 117,0 (1C, C-4'), 115,0 (1C, C-3'), 112,4 (1C, C-6'), 86,3 (1C, C-7), 68,62 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 18,9 (1C,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{15}\text{N}$  HMBC NMR (61,834 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  293,3 (1N, N- $\alpha$ ), 333,1 (1N, N-pyr) ppm.

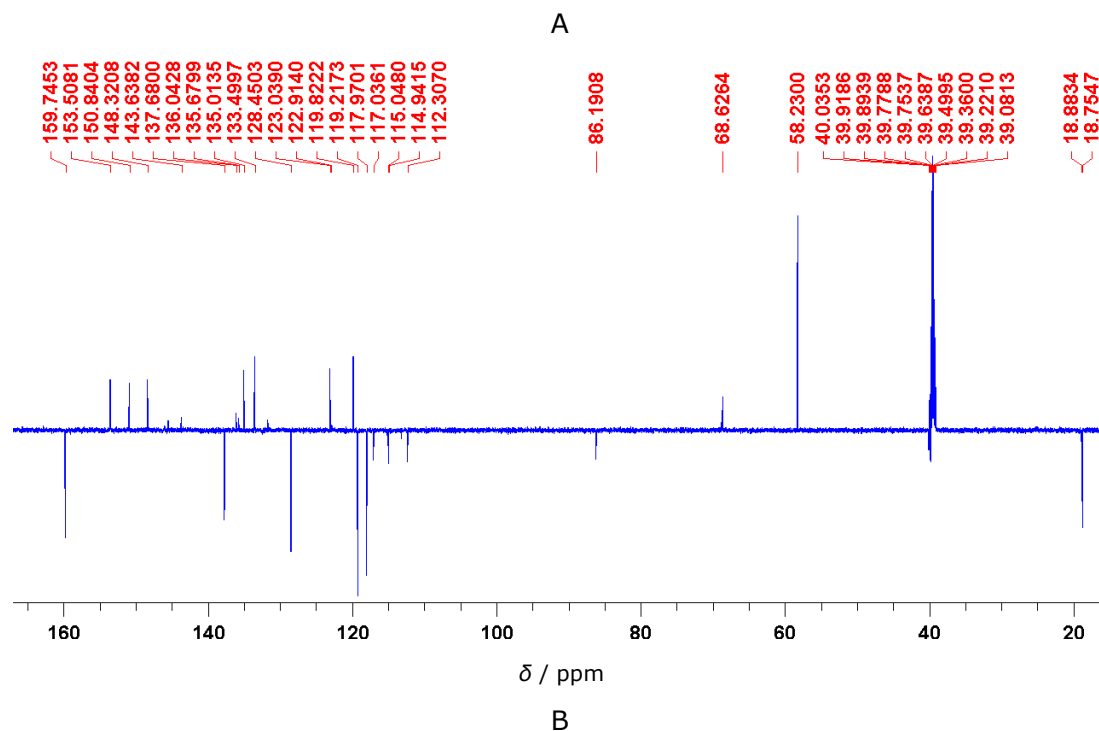
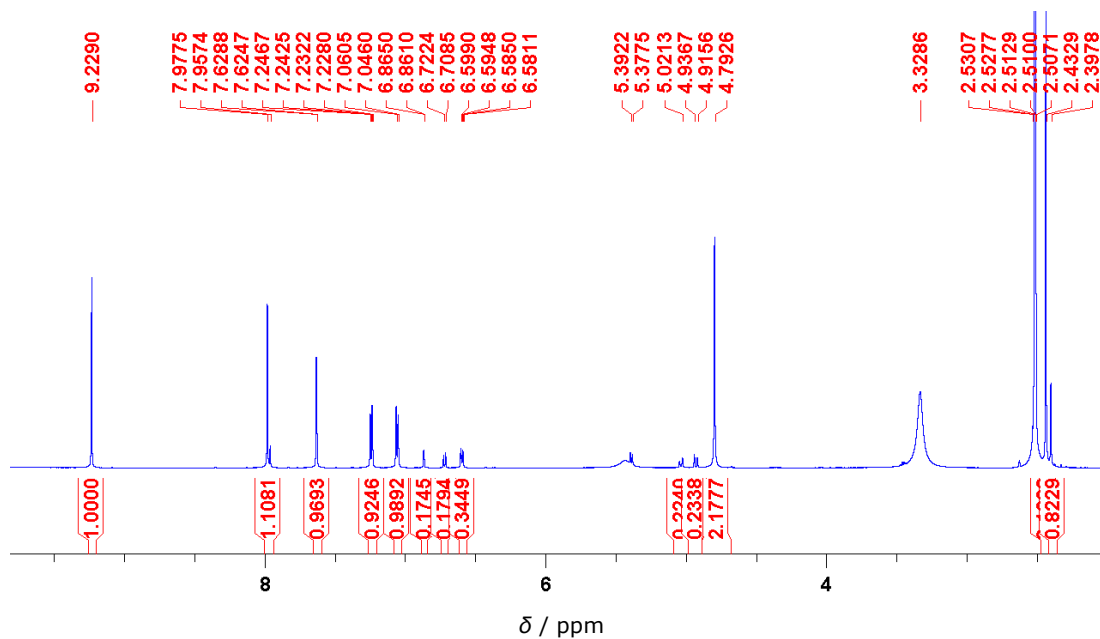
**P4:**  $^1\text{H}$  NMR (600, 130 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  14,41 (1H, br.s, OH-3), 10,36 (1H, s, OH-2'), 9,23 (1H, s, H- $\alpha$ ), 7,97 (1H, s, H-6), 7,62 (1H, d,  $J$  = 2,53 Hz, H-6'), 7,23 (1H, dd,  $J$  = 2,53 Hz,  $J$  = 8,77 Hz, H-4'), 7,06 (1H, d,  $J$  = 8,77 Hz, H-3'), 5,44 (1H, s, OH-5), 4,79 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 2,43 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  159,7 (1C, C- $\alpha$ ), 153,5 (1C, C-3), 150,8 (1C, C-2'), 148,3 (1C, C-2), 137,7 (1C, C-6), 135,0 (1C, C-1'), 133,5 (1C, C-5), 128,5 (1C, C-4'), 123,0 (1C, C-5'), 119,8 (1C, C-4), 119,2 (1C, C-6'), 118,0 (1C, C-3'), 58,2 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 18,8 (1C,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{15}\text{N}$  NMR (61,834 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  63,1 (1N, N- $\alpha$ ), 327,2 (1N, N-pyr) ppm.



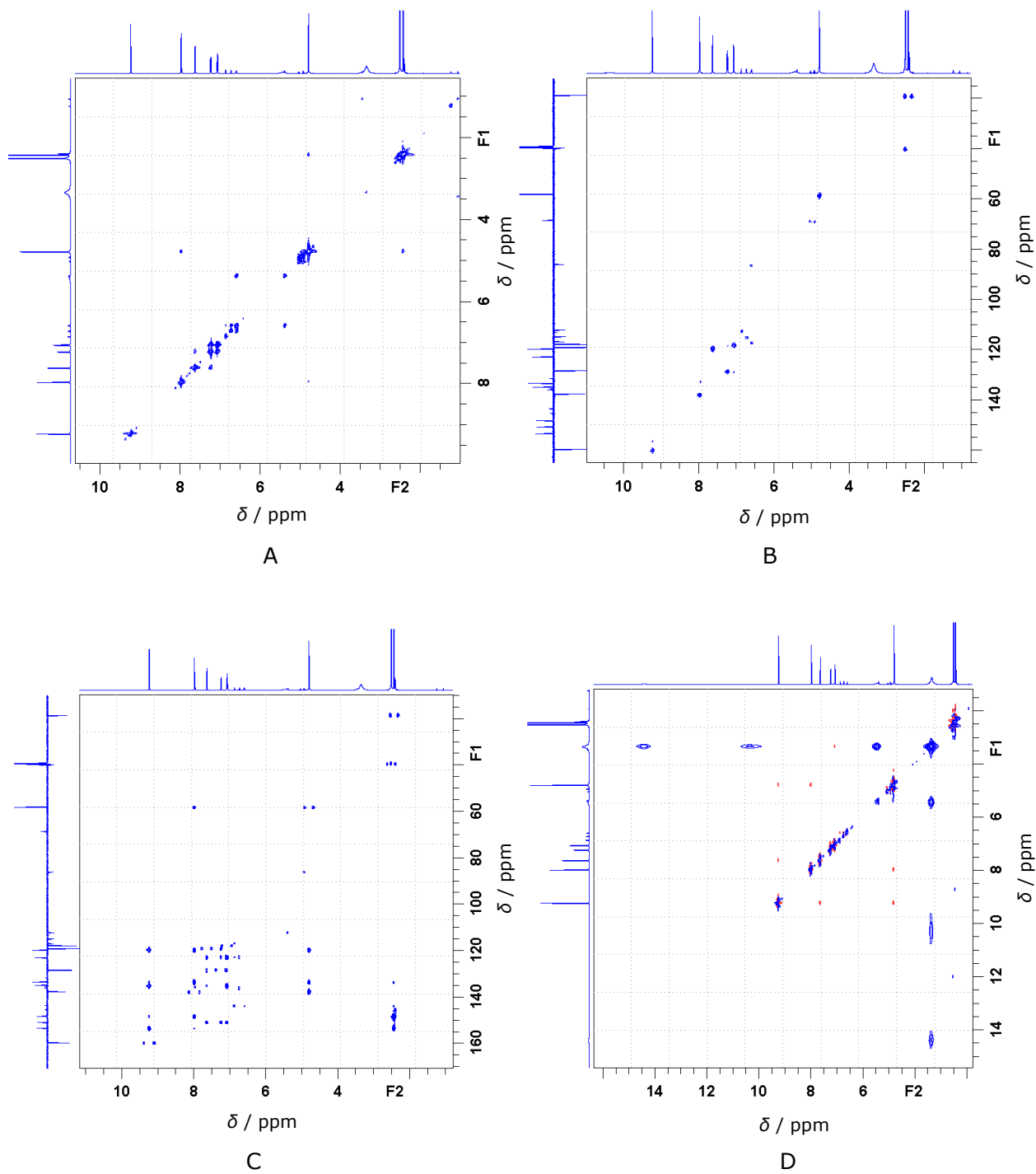
FT-IR ( $\tilde{\nu}$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 2888 (m), 2819 (m), 2703 (m), 2625 (m), 1615 (w), 1483 (m), 1399 (s), 1275 (m), 1257 (m), 1215 (m), 1118 (m), 1016 (m), 912 (m), 824 (m), 763 (w), 713 (w), 660 (w-m), 551 (m), 522 (w).

ESI<sup>+</sup>-MS (MeOH,  $m/z$ ): 150,0 [ $\text{C}_8\text{H}_6\text{NO}_2$ ]<sup>+</sup>, 293,0 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>.

ESI<sup>-</sup>-MS (MeOH,  $m/z$ ): 291,0 [ $\text{M}$ ]<sup>-</sup>.

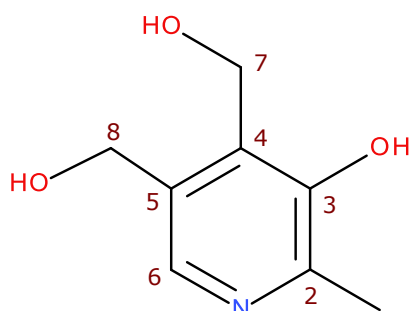


**Slika 15.** A) <sup>1</sup>H i B) <sup>13</sup>C spektar spoja **P3** i **P4**.



**Slika 16.** A)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, C)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY i D)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektar spoja **P3** i **P4**.

#### 4.4. Piridoksin (R1)



**R1**

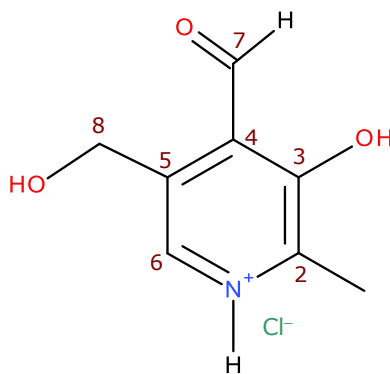
$^1\text{H}$  NMR (600,130 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , 25 °C):  $\delta$  8,12 (1H, s, H-6), 4,79 (2H, s, H-7), 4,71 (2H, s, H-8), 2,61 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -2) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , 25 °C):  $\delta$  151,8 (1C, C-3), 141,3 (1C, C-2), 140,8 (1C, C-4), 138,8 (1C, C-5), 128,7 (1C, C-6), 57,6 (1C, C-8), 55,5 (1C, C-7), 14,6 (1C,  $\text{CH}_3$ -2) ppm.

FT-IR ( $\tilde{\nu}$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3321 (m-s), 3231 (s), 3085 (m), 2814 (s), 1930 (w), 1827 (w), 1732 (w), 1626 (w), 1542 (m), 1482 (m), 1414 (m), 1329 (w), 1275 (m-s), 1215 (m-s), 1088 (m), 1017 (m), 960 (m), 870 (m), 794 (m), 749 (m), 685 (w), 592 (m), 390 (w).

ESI $^+$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 152,0 [ $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2$ ] $^+$ .

ESI $^-$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 150,0 [ $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2$ ] $^-$ .

#### 4.5. Piridoksal x HCl (R2)



**R2**

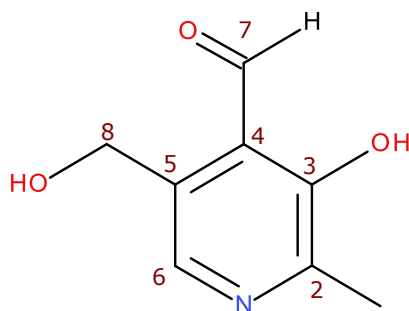
$^1\text{H}$  NMR (600,130 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  8,29 (1H, s, H-6), 6,64 (1H, d,  $J$  = 1,65 Hz H-7), 5,16 (1H, d,  $J$  = 13,87 Hz, H-8a), 5,03 (1H, d,  $J$  = 13,87 Hz, H-8b), 2,63 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -2) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  148,7 (1C, C-3), 142,7 (1C, C-2), 140,8 (1C, C-5), 138,3 (1C, C-4), 125,1 (1C, C-6), 98,2 (1C, C-7), 68,9 (1C, C-8), 14,3 (1C,  $\text{CH}_3$ -2) ppm.  $^{15}\text{N}$  NMR (60,826 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  210,5 (1N, N-pyr) ppm.

FT-IR ( $\tilde{\nu}$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 2975 (m-s), 2838 (m-s), 2611 (s), 1643 (w), 1554 (m), 1443 (m), 1337 (w-m), 1283 (m), 1238 (m), 1056 (m), 1014 (m-s), 918 (m), 872 (m), 708 (m), 644 (w), 584 (w), 500 (w), 452 (w), 388 (m).

ESI $^+$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 150,0 [ $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2$ ] $^+$ .

ESI $^-$ -MS (MeOH,  $m/z$ ): 108,0 (*nije određen*).

#### 4.6. Neutralni piridoksal (R3)



**R3**

$^1\text{H}$  NMR (600,130 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  7,96 (1H, s, H-6), 6,46 (1H, s, H-7), 5,05 (1H, d,  $J$  = 12,93 Hz, H-8a), 4,87 (1H, d,  $J$  = 12,93 Hz, H-8b), 2,41 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -2) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (150,903 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  146,3 (1C, C-3), 144,9 (1C, C-2), 135,5 (1C, C-5), 134,6 (1C, C-4), 131,2 (1C, C-6), 98,4 (1C, C-7), 68,8 (1C, C-8), 17,5 (1C,  $\text{CH}_3$ -2) ppm.  $^{15}\text{N}$  NMR (60,826 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  286,5 (1N, N-pyr) ppm.

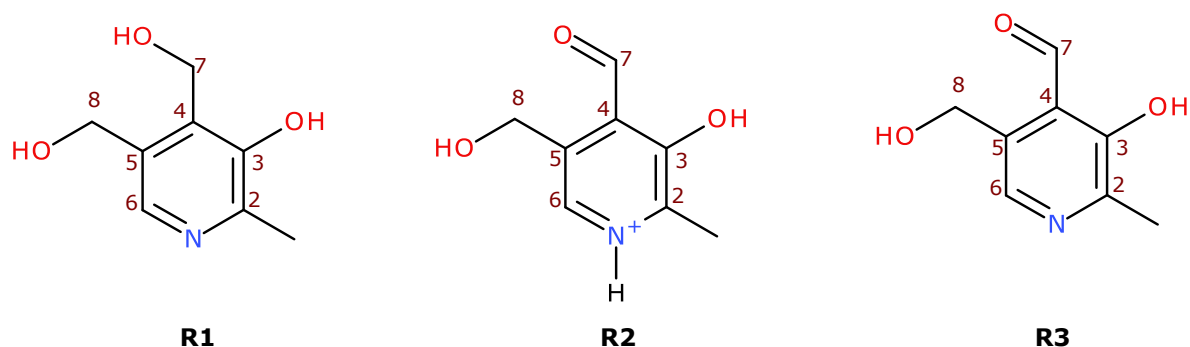
## 5. RASPRAVA

Izravnom sintezom iz reaktanata pripremljeni su novi spojevi derivata vitamina B<sub>6</sub> (**P1** – **P4**), i to piridoksina i piridoksala (Tablica 1).

**Tablica 1.** Novosintetizirani spojevi **P1** – **P4**.

Oznaka spoja	Naziv	Formula	Tautomer
<b>P1</b>	Z-L-Phe- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	/
<b>P2</b>	Boc-Ala- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	/
<b>P3</b>	N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalimin	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	keto-aminski
<b>P4</b>	N-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalamin	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	enol-iminski

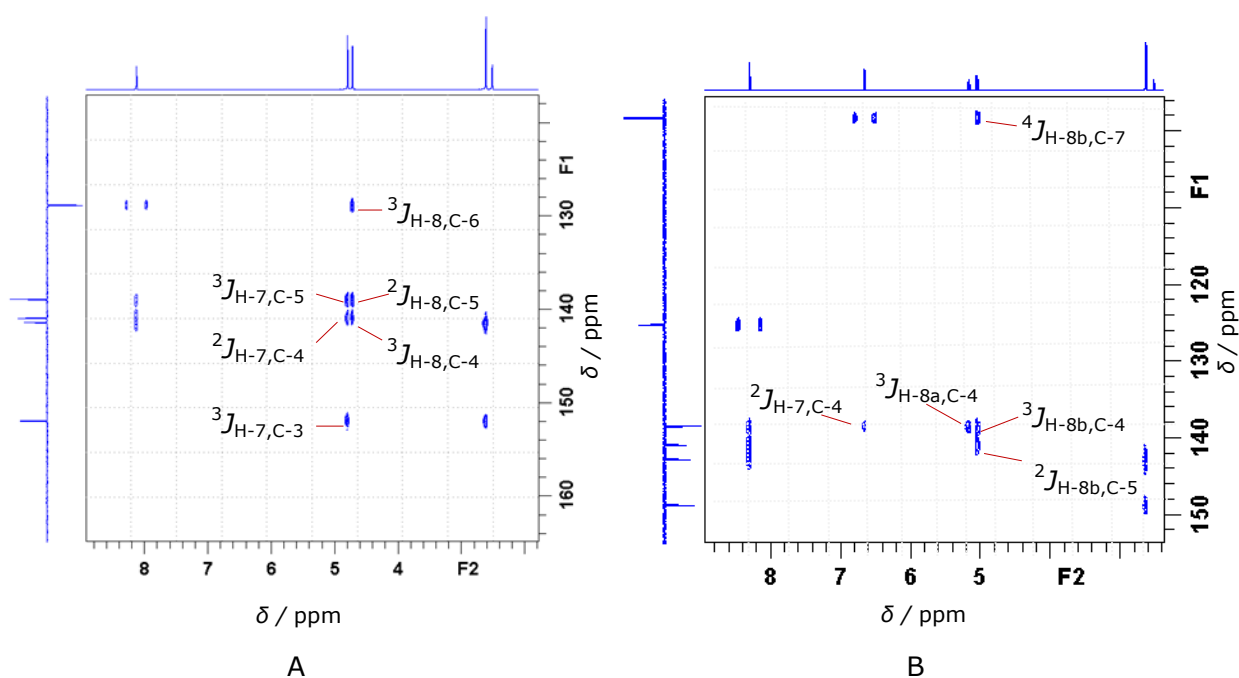
Strukture reaktanata **R1** – **R3** okarakterizirane su pomoću 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C APT) i 2D heteronuklearnih tehnika spektroskopije NMR u otopini (<sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N HMBC), a pri asignaciji spojeva koristilo se brojanje atoma prikazano na slici 17. Osim prethodno navedenih tehnika NMR, pri asignaciji pripremljenih produkata korištene su i homonuklearne 2D tehnike NMR i to <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY te <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NOESY.



**Slika 17.** Brojanje atoma kod reaktanata primijenjeno pri asignaciji u spektroskopiji NMR.

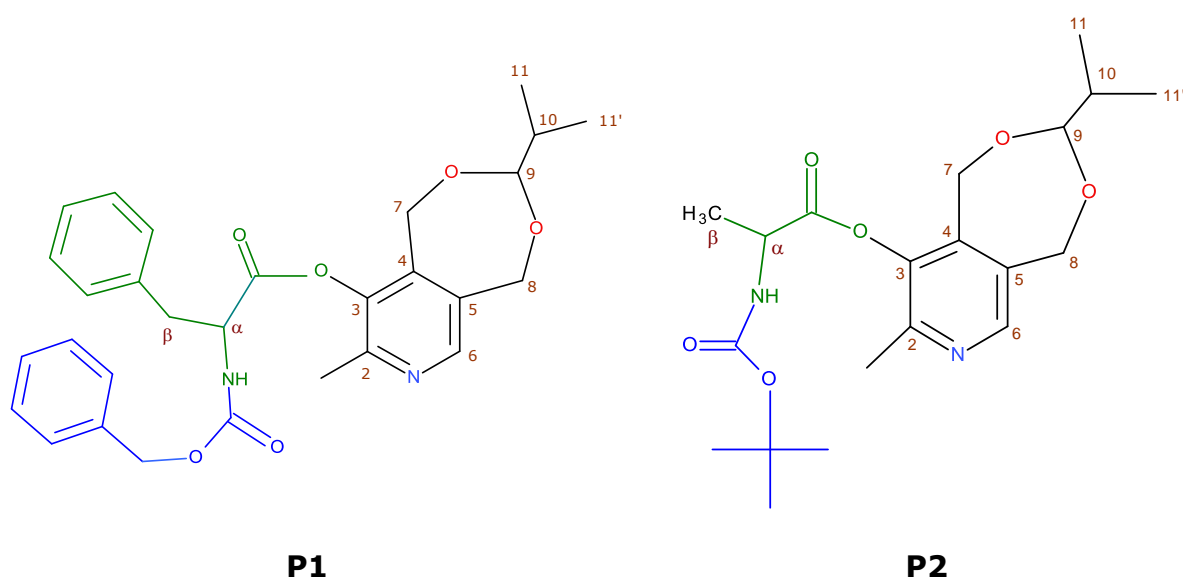
Kako je tema ovog diplomskog rada vezana uz istraživanje derivata vitamina B<sub>6</sub>, snimljeni su i spektri NMR samih reaktanata (**R1** – **R3**) kako bi se nakon reakcije vezanja s aminokiselinama, odnosno s 2-amin-4-klorfenolom moglo komentirati mjesto vezanja, odnosno utjecaj na piridinski prsten. Većina signala u

spektu spojeva **R1** – **R3** assignirana je po njihovom kemijskom pomaku, multiplicitetu te izračunatim integralima. Ipak, zbog što točnije assignacije snimljen je i 2D  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektar za spojeve **R1** (Slika 18.A) i **R2** (Slika 18.B). Pri assignaciji signala u spektru spoja **R1**, nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti koji signal u  $^1\text{H}$  spektru pripada jezgri H-8, odnosno H-7, kao niti koji signal pripada kojem kvartetu u  $^{13}\text{C}$  spektru (C-2, C-3, C-4, C-5). Križni signali u  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektru pokazuju skalarnu spregu između jezgri atoma H-8 i C-6, H-7 i C-3 te H-7 i C-2 što potvrđuje da je kemijski pomak signala H-8 pri 4,71 ppm, a signala H-7 pri 4,79 ppm. Također, i pri assignaciji spoja **R2** nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti koji signal pripada kojem kvarternom  $^{13}\text{C}$  atomu u spektru, niti koji signal u  $^1\text{H}$  spektru pripada jezgri atoma H-8a, odnosno H-8b. Križni signali u  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektru pokazuju skalarnu spregu između jezgri atoma H-8a i H-8b s C-4, H-8b i C-5 te H-8b i C-7 što potvrđuje da je kemijski pomak signala H-8a pri 5,16 ppm, a signala H-8b pri 5,03 ppm. Svi navedeni križni signali s označenim spregama prikazani su na slici 18.A i B.



**Slika 18.**  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektar spojeva A) **R1** i B) **R2**.

Reakcijom L-fenilalanina čija je amino skupina zaštićena sa Z zaštitnom skupinom (karboksibenzil), odnosno L-alanina kod kojeg je na amino skupini vezana Boc zaštitna skupina (*tert*-butiloksikarbonil) s  $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksinom (IBP) uz dodatak dicikloheksilkarbodiimida (DCC) sintetizirani su spojevi **P1** i **P2** čija je struktura u otopini okarakterizirana spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa, a u čvrstom stanju spektroskopijom IR. Predložene strukture produkata prikazane su na slici 19 zajedno s brojanjem atoma koje je korišteno pri asignaciji spojeva.

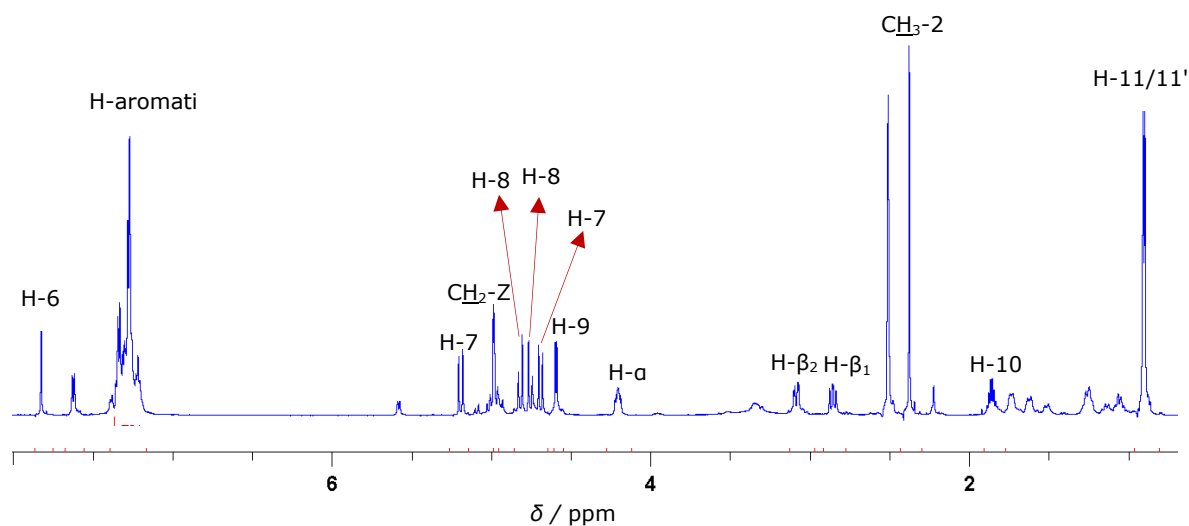


**Slika 19.** Predložene strukture spojeva **P1** i **P2**. Zelenom bojom označena je aminokiselina, a plavom njena zaštitna skupina.

Prema položaju signala u  $^1\text{H}$  spektru NMR spoja **P1** asignirane su jezgre  $^1\text{H}$ -atoma dvaju benzenskih i jednog piridinskog prstena koje dolaze kao multiplet u području od 7,42 – 7,16 ppm (Slika 20). Iz istog su spektra, po kemijskom pomaku, ali i po izračunatom integralu, asignirane i tri metilne ( $-\text{CH}_3$ ) skupine.  $\text{CH}_3$ -2 skupina na piridinskom prstenu dolazi pri 2,37 ppm.  $\text{CH}_3$ -11/11' skupine izobutilidena su simetrične, dolaze pri 0,90 ppm, a dobiveni signal pocijepan je u dublet zbog vicinalne sprege s jezgrom atoma H-10. Također, signali pri 2,85 ppm i 3,08 ppm, kao što je već poznato iz literature, pripisani su jezgrama atoma H- $\beta_1$  i H- $\beta_2$  fenilalanina.<sup>29</sup> Njihov signal u  $^1\text{H}$  spektru NMR dolazi kao dublet dubleta (dd) zbog njihove međusobne (geminalne) sprege, te zbog vicinalne sprege s jezgrom

H- $\alpha$  atoma. Asignirane su i tri  $-\text{CH}_2$  skupine.  $-\text{CH}_2$  skupina zaštite Z dolazi pri 4,98 ppm, a dvije  $-\text{CH}_2$  skupine iz izobutiliden piridoksina pri 5,18 i 4,68 ppm, odnosno pri 4,81 i 4,74 ppm. Također, iz  $^1\text{H}$  spektra asignirana je i jezgra atoma H-9 čiji se signal nalazi pri 4,59 ppm te jezgra atoma H-10 pri 1,86 ppm. Najodsjenjeniji signal pri 7,83 ppm pripada jezgri atoma H-6. Vezanjem fenilalanina, ali i zbog nastanka izobutiliden piridoksina u spoju **P1**, vidljivo je zasjenjenje signala  $\text{CH}_3$ -2 ( $-0,24$  ppm) i H-6 ( $-0,29$  ppm) u  $^1\text{H}$  spektru. Sve razlike u pomaku signala ( $\Delta\delta$  / ppm) prije ( $\delta_{\text{slobodno}}$ ) i nakon vezanja ( $\delta_{\text{vezano}}$ ) izračunate su prema relaciji 1-6.

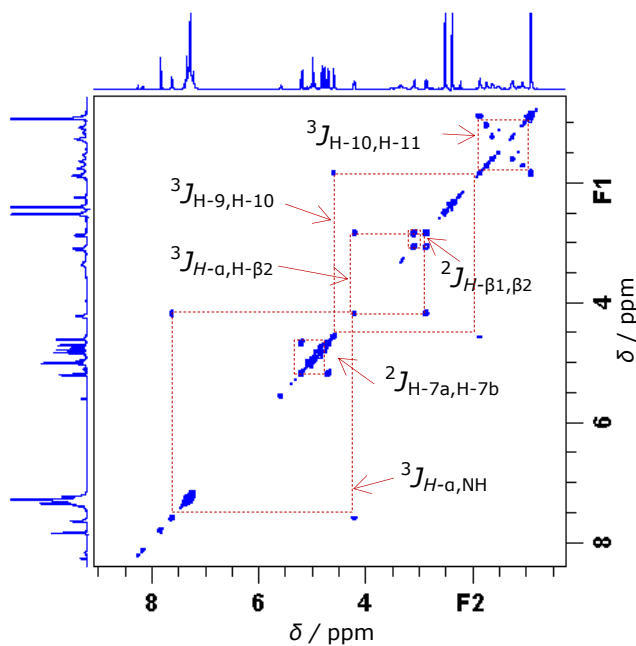
$$\Delta\delta = \delta_{\text{vezano}} - \delta_{\text{slobodno}} \quad (1-6)$$



**Slika 20.**  $^1\text{H}$  spektar spoja **P1**.

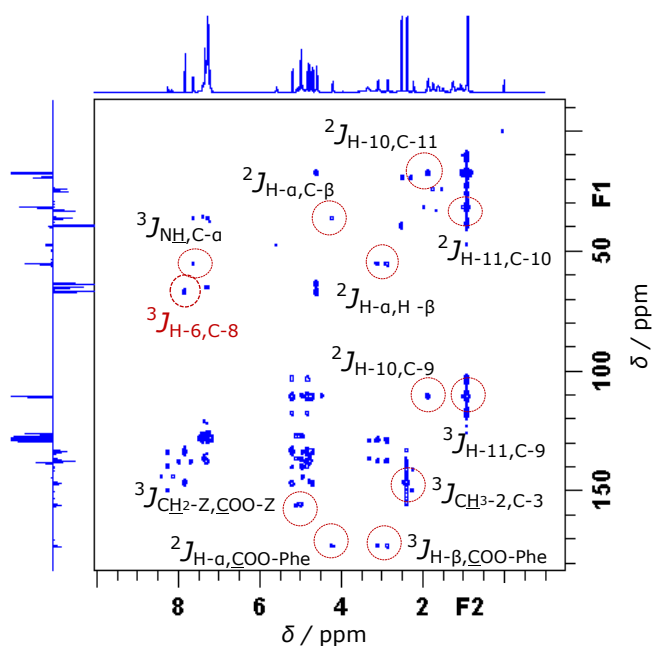
Osim očekivanih križnih signala između jezgri H-atoma samog fenilalanina (H- $\alpha$  i H- $\beta$ , H- $\beta_1$  i H- $\beta_2$ , H- $\alpha$  i NH), križni signali u  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY spektru spoja **P1** potvrđuju i spinski sustav H-11 / H-10 / H-9, te otkrivaju signale jezgri atoma H-7a i H-7b (Slika 21).





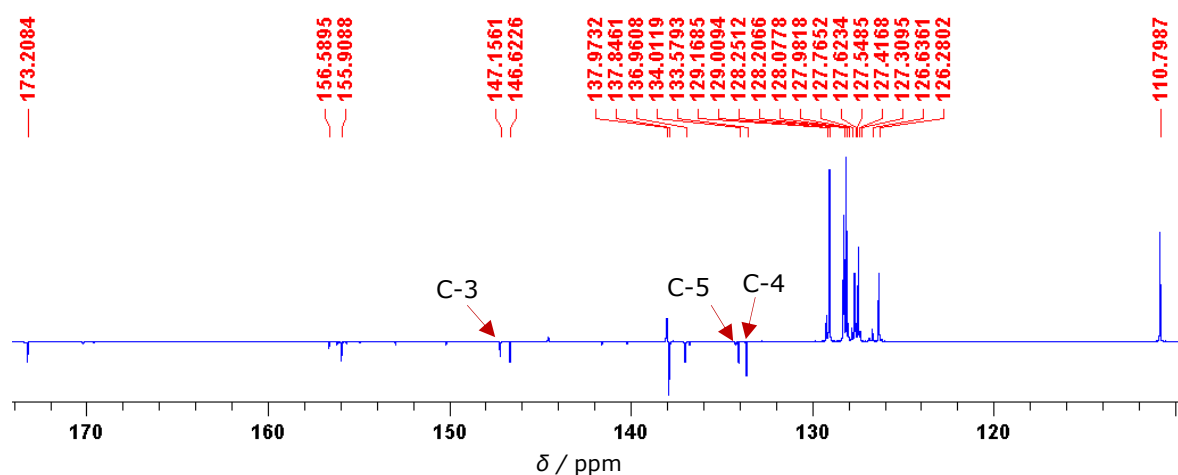
**Slika 21.**  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  COSY spektar spoja **P1**.

Križni signali u  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  HMBC spektru istog spoja potvrđuju asignaciju signala iz  $^1\text{H}$  spektra NMR, ali otkrivaju i točan položaj signala jezgri atoma C-7 i C-8. Naime, C-8 pokazuje spregu s jezgrom atoma H-6 kroz tri kemijske veze ( $^3J_{\text{H-6,C-8}}$ ) što je na slici 22 označeno crvenom bojom. Na slici 22 također su označeni i ostali križni signali važni u asignaciji  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  signala ovog spoja.



**Slika 22.**  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  HMBC spektar spoja **P1**.

U spoju **P1** atomi C-3, C-4 i C-5 piridinskog prstena direktno sudjeluju u vezanju, stoga se u  $^{13}\text{C}$  spektru ovog spoja očekuju najveći pomaci upravo njihovih signala u odnosu na pomake u molekuli slobodnog piridoksina. Usporedbom pomaka u  $^{13}\text{C}$  APT spektru vidljivo je da kod **P1** dolazi do zasjenjenja svih triju signala jezgri i to kod jezgre atoma C-3 za  $-4,7$  ppm, kod jezgre atoma C-4 za  $-7,2$  ppm, a kod jezgre atoma C-5 za  $-4,8$  ppm (Slika 23). Razlika pomaka signala jezgri atoma C-2 iznosi  $5,2$  ppm i C-6  $9,2$  ppm u odnosu na molekulu **R1**, a njihovo odsjenjenje potvrđuje sudjelovanje atoma C-3, C-4 i C-5 u direktnom vezivanju.

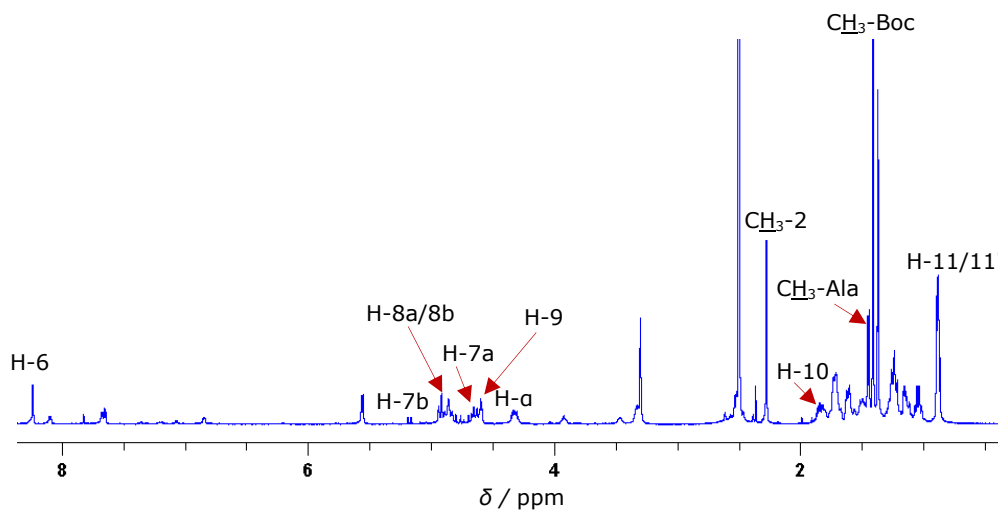


**Slika 23.**  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **P1**.

Na jednak način, na temelju kemijskih pomaka, multipliciteta i integrala u  $^1\text{H}$  spektru NMR spoja **P2** asignirane su jezgre  $^1\text{H}$ -atoma. Izobutiliden piridin također je prisutan i u strukturi ovog derivata pa se očekuju slični pomaci signala kao i kod spoja **P1**. Signal  $\text{CH}_3$ -2 skupine supstituirane na piridinskom prstenu dolazi pri  $2,37$  ppm (Slika 24). Dvije metilne skupine izobutilidena ( $\text{CH}_3$ -11/11') su simetrične, a njihov signal, rascijepan u dublet zbog vicinalne sprege s jezgrom atoma H-10, dolazi pri  $0,90$  ppm. Signal pri  $1,45$  ppm pripisan je metilnoj skupini alanina (H- $\beta$ ), a signal pri  $1,41$  ppm trima metilnim skupinama zaštitne skupine Boc. Signal jezgre H- $\alpha$  atoma alanina asigniran je pri  $4,32$  ppm. Iz spektra su također asignirane i dvije  $-\text{CH}_2$  skupine izobutiliden piridoksina i to pri  $4,68$  i  $5,18$  ppm, odnosno  $4,84$  i  $4,93$  ppm. Signal pri  $4,59$  ppm pripisan je jezgri

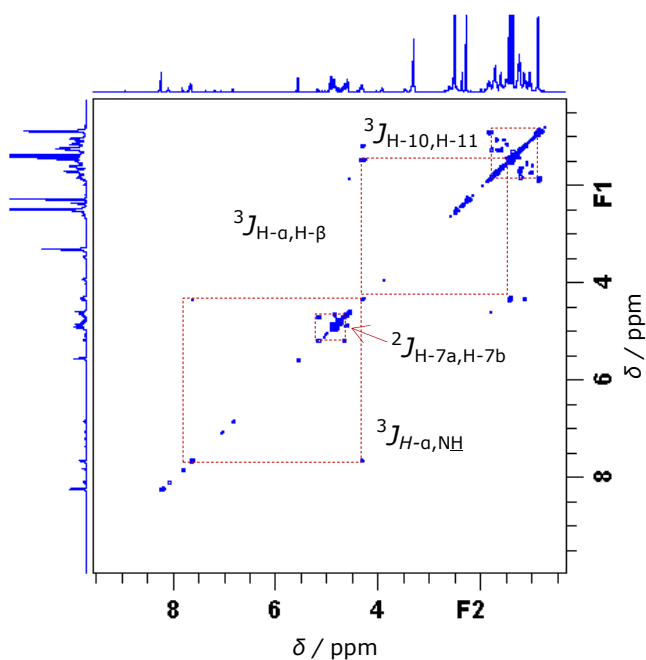
atoma H-9, a onaj pri 1,86 ppm jezgri atoma H-10. Kao i kod spoja **P1**, najodsjenjeniji

signal pri 8,26 ppm pripada jezgri atoma H-6. Zbog promjene okoline piridoksina u spoju **P2** nastankom izobutiliden piridoksina, opaženo je zasjenjenje signala  $\text{CH}_3\text{-2}$  (−0,28 ppm) i H-6 (−0,14 ppm) u  $^1\text{H}$  spektru NMR.



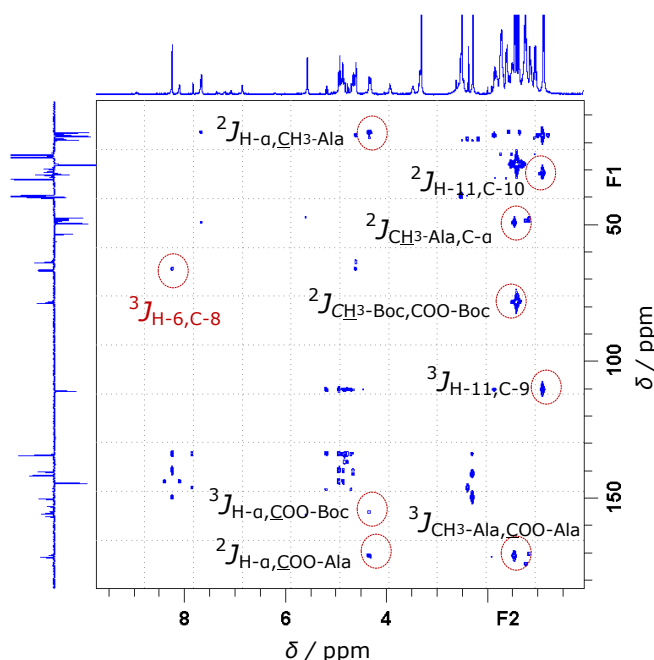
**Slika 24.**  $^1\text{H}$  spektar spoja **P2**.

Iz križnih signala u  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  COSY spektru i ovdje je potvrđen spinski sustav H-10 / H-11 te su otkriveni pripadajući signali jezgri atoma H-7a i H-7b. Ostali križni signali, pronađeni unutar same aminokiseline, označeni su na slici 25.



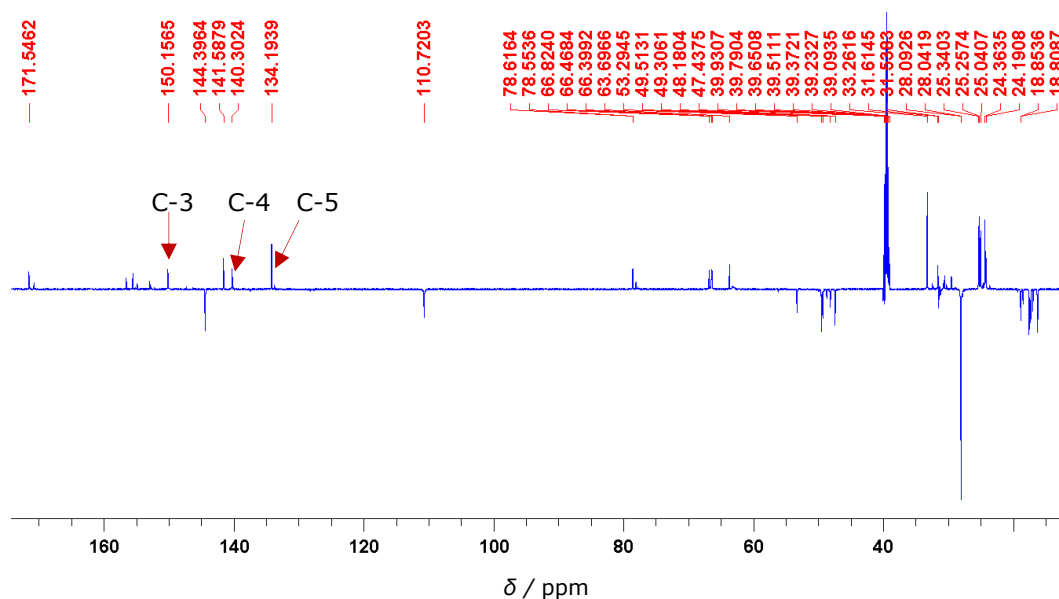
**Slika 25.**  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  COSY spektar spoja **P2**.

Križni signali u  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektru (Slika 26) potvrđuju asignaciju signala iz  $^1\text{H}$  spektra NMR te otkrivaju točan položaj signala jezgri atoma H-7 i H-8 jer se jezgra atoma C-8 spreže s jezgrom atoma H-6 kroz tri kemijske veze ( $^3J_{\text{H-6,C-8}}$ ). Zahvaljujući i ostalim spregama u  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektru, također označenima na slici 26, potvrđeni su i pripadajući signali svih ostalih  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  jezgara pripravljenog spoja u spektrima NMR. Jezgra atoma  $^1\text{H}$  iz metilne skupine aminokiseline (H- $\beta$ ) pokazuje spregu s jezgrom H- $\alpha$  atoma, metilna skupina iz piridina ( $\text{CH}_3$ -6) s C-2, metilenske skupine iz Boc zaštitne skupine s njegovim karbonilnim C atomom, a simetrične metilne skupine izobutila s jezgrom atoma H-10. Zbog pronađenih sprega u  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektru signale metilnih skupina lako je pripisati pripadajućim jezgrama u molekuli.



**Slika 26.**  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC spektar spoja **P2**.

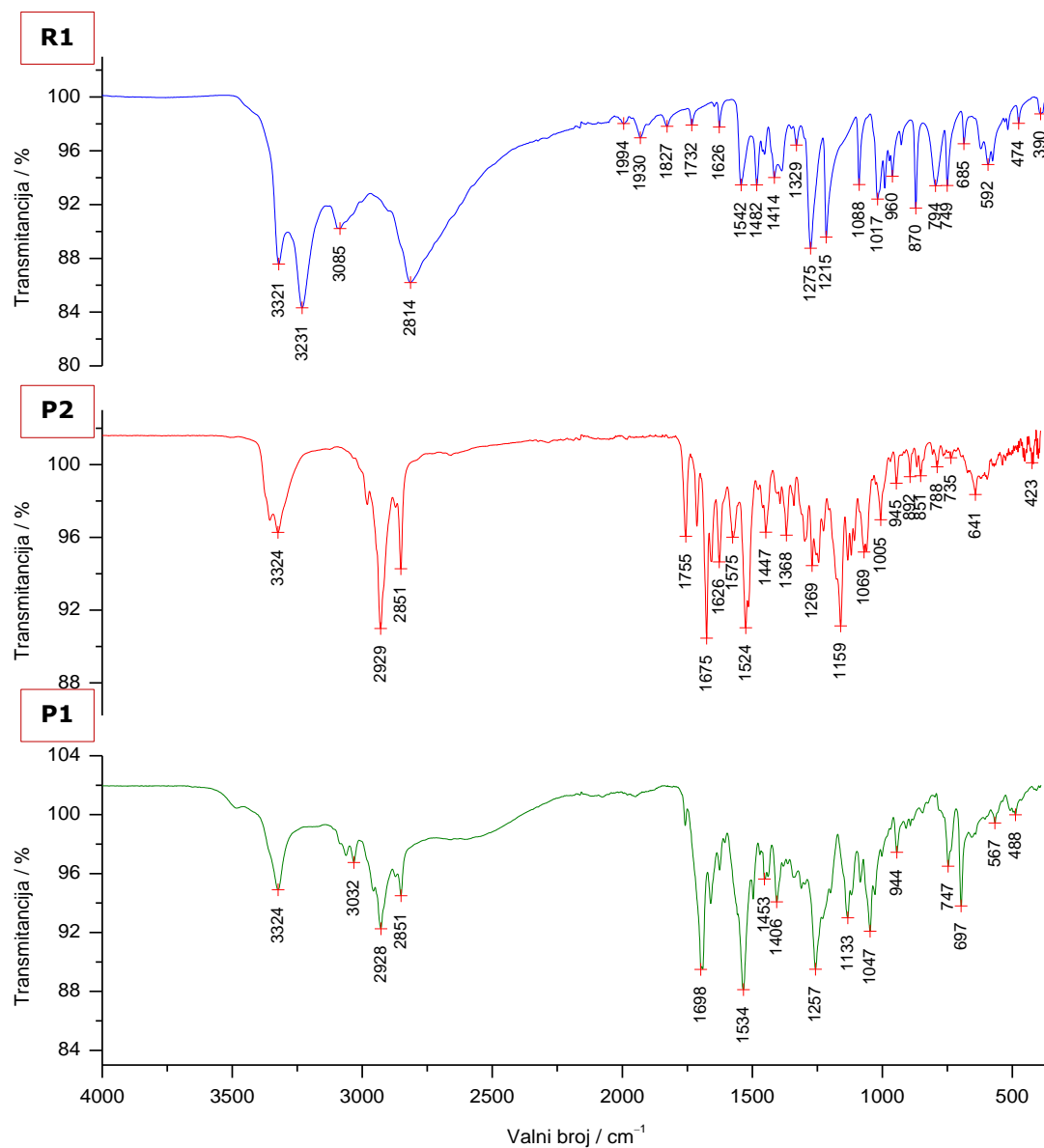
Kao i kod spoja **P1**, jezgre atoma C-3, C-4 i C-5 piridinskog prstena sudjeluju u direktnom vezanju u pripravljenom derivatu piridoksina, stoga se očekuju različiti pomaci u spektru  $^{13}\text{C}$  spoja **P2** u odnosu na one u spektru slobodnog piridoksina. Iz  $^{13}\text{C}$  spektra (Slika 27) vidljivo je kako se signal jezgre C-3 atoma u **P2** nalazi pri 149,6 ppm (–2,2 ppm), signal jezgre C-4 pri 140,3 ppm (–0,5 ppm) te signal jezgre C-5 pri 134,2 ppm (–4,6 ppm). Odsjenjene signala jezgri atoma C-2 za 5,2 ppm i C-6 za 13,6 ppm kao i kod spoja **P1** potvrđuju sudjelovanje atoma C-3, C-4 i C-5 u direktnom vezanju.



**Slika 27.** <sup>13</sup> spektar spoja **P2**.

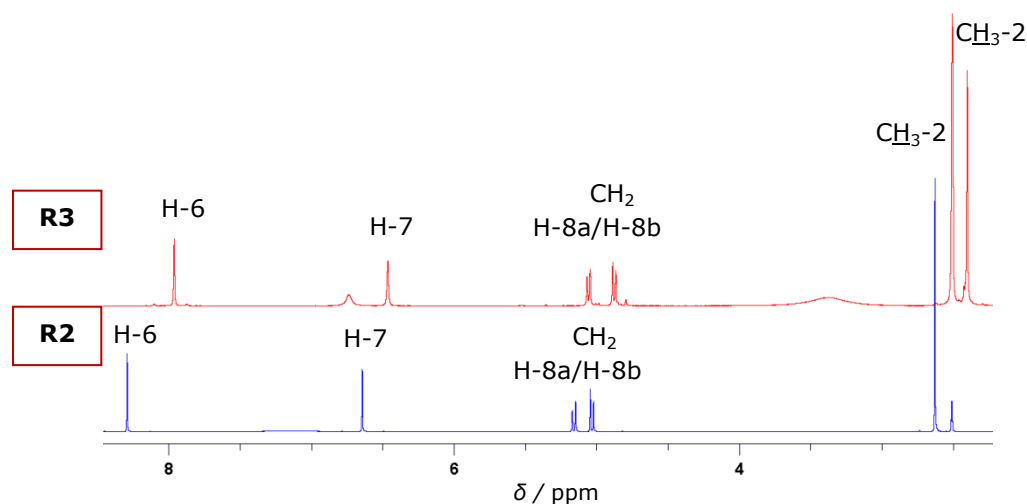
Nastanak novosintetiziranih spojeva u čvrstom stanju u spektrima IR zračenja (Slika 28) potvrđuje promjena oblika, nastanak novih kao i pomicanje starih vibracijskih vrpca. Supstitucija na tri OH skupine piridoksina očituje se u promjeni oblika i nastanku novih vrpca istezanja O—H skupine u području od 3500 — 2750 cm<sup>-1</sup>. U pripravljenim spojevima pojavljuje se i vrpca karakteristična za karbonilnu skupinu i to kod spoja **P1** pri 1698 cm<sup>-1</sup>, a kod spoja **P2** pri 1755 cm<sup>-1</sup>.

Primijenjena ionizacija od 135 V u spektrometriji masa pokazala se prejaka za spojeve **P1** i **P2** te je uzrokovala degradaciju molekule na fragmente u ionizacijskoj ćeliji, tako da detektor ne bilježi molekulski ion već samo dijelove molekule.



**Slika 28.** FT-IR spektri spojeva **R1**, **P2** i **P1**.

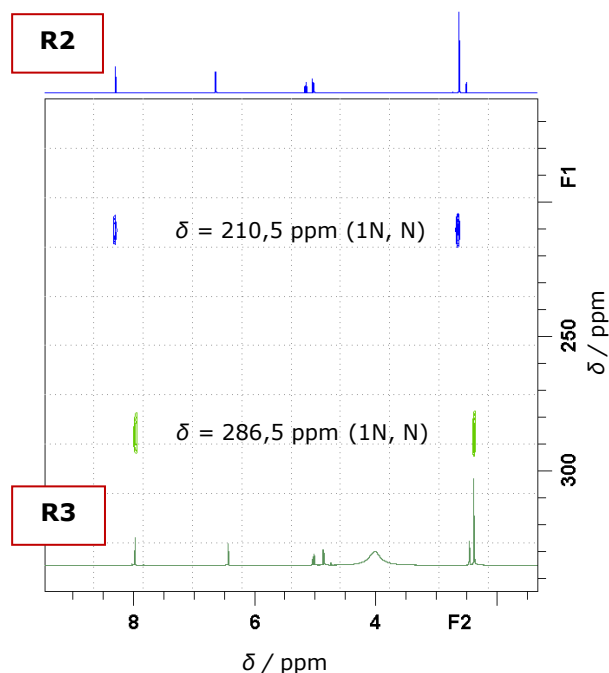
Kao drugi derivat vitamina B<sub>6</sub> u ovom radu odabran je piridoksal hidroklorid (**R2**) koji je prije reakcije sinteze s 2-amin-4-klorfenolom u etanolnoj otopini neutraliziran dodatkom ekvivalentne količine NaOH (1 : 1). Reakciju neutralizacije potvrđuju promjena boje iz bezbojne u žutu odmah po dodatku hidroksida, kao i kemijski pomaci signala jezgri <sup>1</sup>H-atoma u spektru NMR. Jezgre <sup>1</sup>H-atoma neutralnog piridoksala (**R3**) zasjenjene su za od −0,1 do −0,3 ppm u odnosu na pomake signala u <sup>1</sup>H spektru spoja **R2** (Slika 29). Najviše se zasjenjuju jezgre atoma H-6 (−0,33 ppm) i CH<sub>3</sub>-2 (−0,22 ppm) smještene u *ortho*- položaju prema dušikovom atomu piridoksalnog prstena. Dušik u spoju **R2**, kao elektronegativniji atom, zbog pozitivnog naboja privlači k sebi elektronske parove susjednih ugljikovih atoma što se očituje u odsjenjenju njihovih jezgri u <sup>1</sup>H spektru NMR spoja **R2**. U neutralnom obliku piridoksala (**R3**) jezgre <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C-atoma imaju veću gustoću elektrona pa rezoniraju u višem magnetskom polju što se očituje kao zasjenjenje signala jezgri <sup>1</sup>H-atoma u spektrima NMR. Kemijski pomaci signala OH skupina na položajima 3 i 2' u <sup>1</sup>H spektrima NMR (δ > 7 ppm) spojeva **P3** i **P4** ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



**Slika 29.** Prikaz usporedbe kemijskih pomaka signala u <sup>1</sup>H spektrima NMR spojeva **R2** i **R3**.

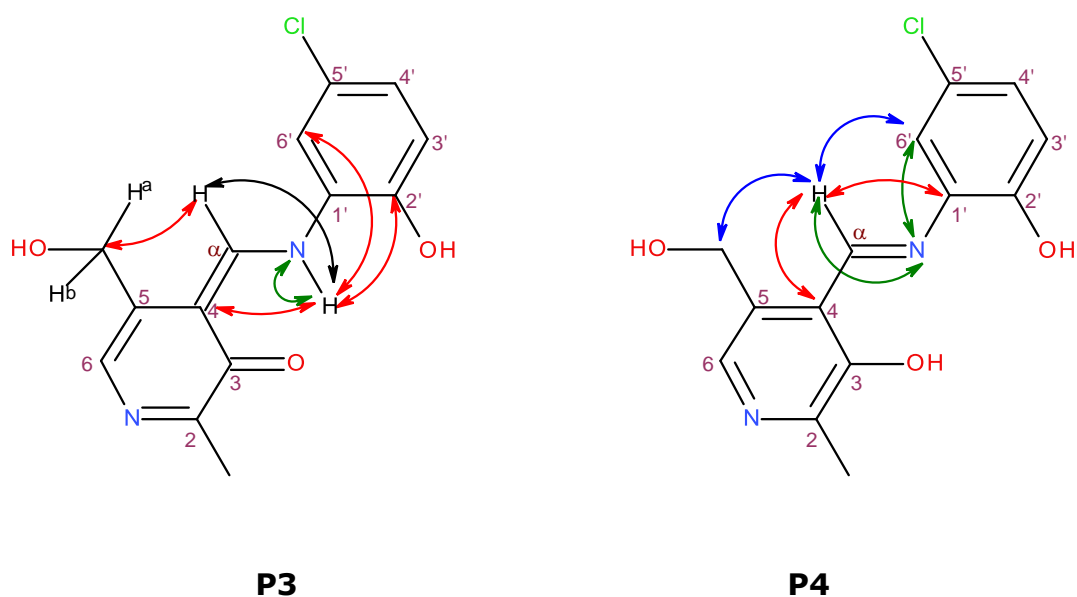


Neutralizacija je dokazana i razlikom u kemijskom pomaku signala jezgre  $^{15}\text{N}$ -atoma između spoja **R2** i **R3** i to očitavanjem iz spektra dobivenog tehnikom  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC. Uklanjanjem H-atoma u spoju **R3** jezgra atoma dušika se odsjenjuje za 76,00 ppm (Slika 30).



**Slika 30.** Prikaz usporedbe kemijskih pomaka signala jezgre  $^{15}\text{N}$ -atoma piridoksala u  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC spektru spojeva **R2** i **R3**.

Reakcijom **R3** s 2-amin-4-klorfenolom u množinskom omjeru 1 : 1 sintetizirana je Schiffova baza koja dolazi u obliku dvaju tautomera i to keto-aminskog (**P3**) i enol-iminskog (**P4**) kao što je i prikazano na slici 31. Schiffova baza pripravljena je iz acetonitrilne otopine reakcijom kondenzacije uz vodeno hladilo, pri temperaturi od oko 80 °C i uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici. Odmah po miješanju reaktanata dolazi do stvaranja taloga narančaste boje. Nakon otprilike 2 sata od početka reakcije, magnetska miješalica se isključi, a talog ostavi da se hladi. Dobiveno iskorištenje jako je dobro i iznosi oko  $\approx 91\%$ .

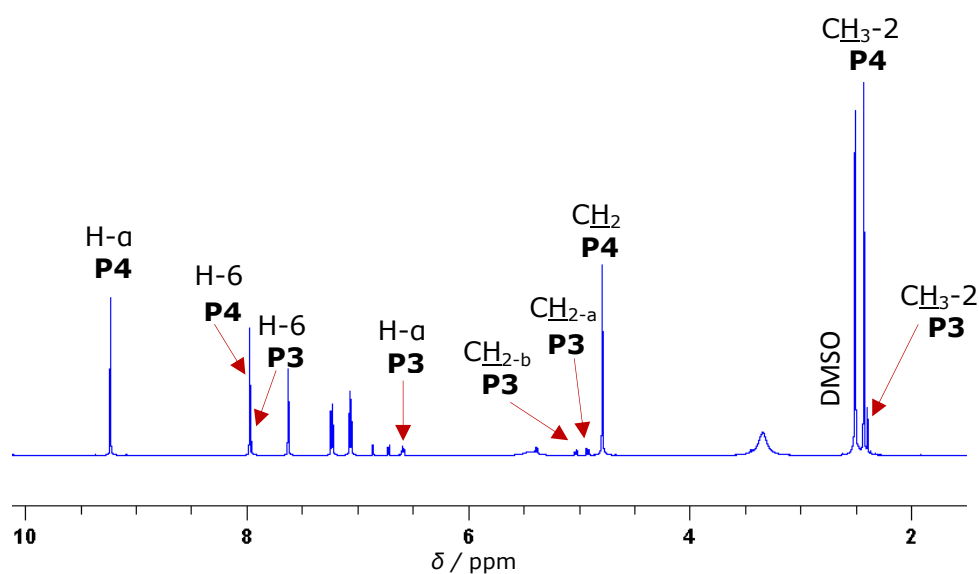


**Slika 31.** Keto-aminski (**P3**) i enol-iminski (**P4**) tautomer Schiffove baze. Označeno je brojanje atoma korišteno pri asignaciji u spektroskopiji NMR. Crvenom bojom označene su sprege opažene u  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, zelenom u  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC, crnom u  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, a plavom u  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektru.

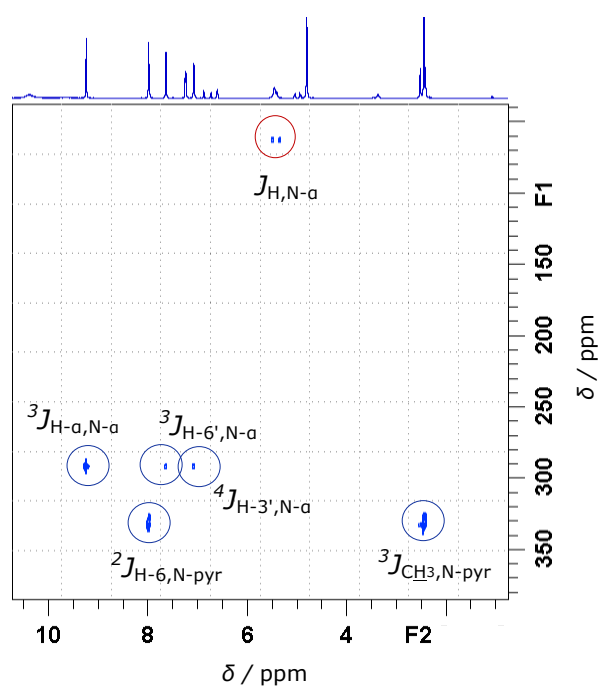
U  $^1\text{H}$  spektru NMR sintetizirane Schiffove baze vidljiva su dva seta signala vrlo sličnih kemijskih pomaka, no različitog intenziteta. Pomoću 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT) i 2D tehnika NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  HMBC) asigniran je svaki izomer pojedinačno, ali i potvrđena keto-enolna tautomerija pripravljenog spoja.

Nastanak Schiffove baze potvrđuje nestanak signala aldehidnog H-atoma pri 6,46 ppm i nastanak novih signala jezgre H- $\alpha$  atoma u spektru i to pri 6,58 ppm kod **P3**, odnosno pri 9,23 ppm kod **P4**. Također, nastankom Schiffove baze zasjenjuju se gotovo svi  $^1\text{H}$ -atomi piridoksalnog prstena od -0,01 do -0,08 ppm (Slika 32). Veće zasjenjenje primijećeno je kod keto-aminskog tautomera (**P3**). Kemijski pomak signala jezgre  $^{15}\text{N}$ - $\alpha$  atoma nastalih tautomera također se međusobno razlikuju po kemijskom pomaku što je vidljivo iz 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC spektra prikazanog na slici 33. Kod spoja **P3** kemijski pomak signala jezgre  $^{15}\text{N}$ - $\alpha$  atoma nalazi se pri 63,1 ppm i pokazuje skalarnu spregu s direktno vezanim

H-atomom. Kod spoja **P4** isti signal se nalazi pri 293,3 ppm, a skalarno se spreže s jezgrama H- $\alpha$ , H-6' i H-3' atoma.

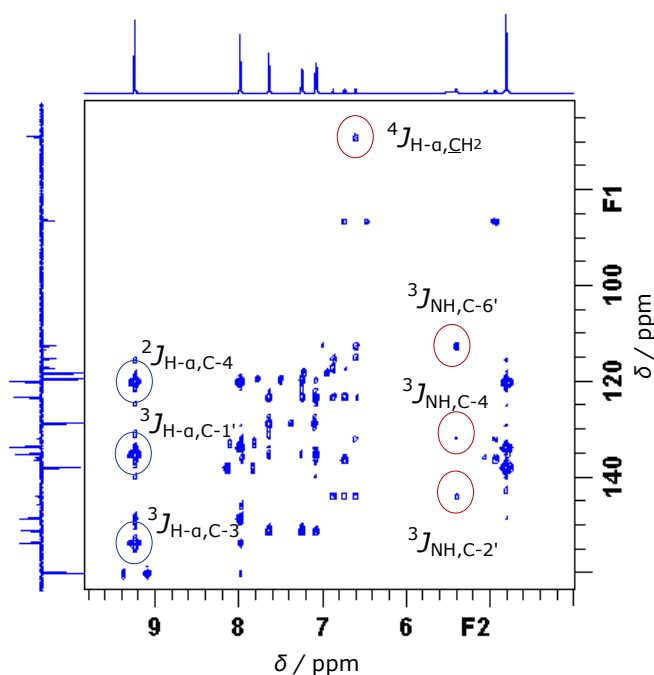


**Slika 32.**  $^1\text{H}$  spektar spojeva **P3** i **P4**.



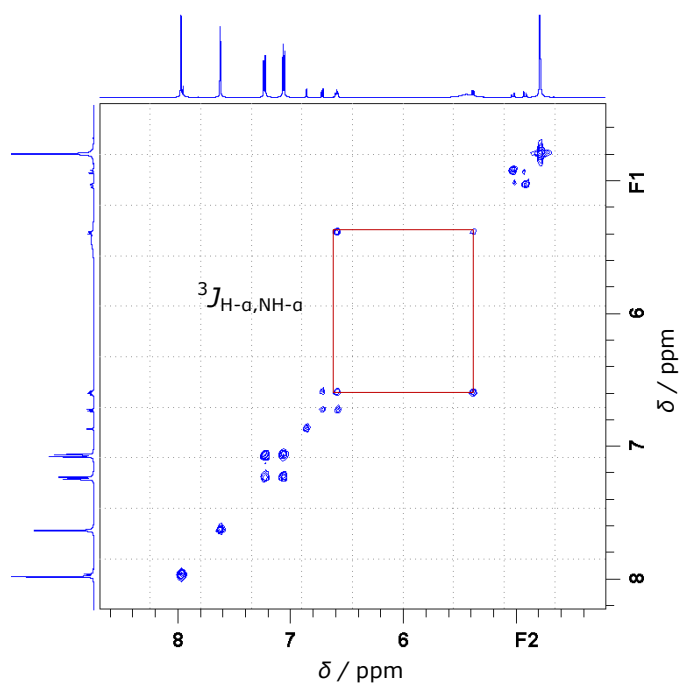
**Slika 33.**  $^1\text{H}$ — $^{15}\text{N}$  HMBC spektar spojeva **P3** (označeno crveno) i **P4** (označeno plavo).

Ostali pripadajući signali za svaki tautomer otkriveni su pomoću križnih signala iz  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  HMBC spektra (Slika 34). Križni signali u  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  HMBC spektru pokazuju spregu kroz četiri veze kod spoja **P3** i to jezgre H- $\alpha$  atoma s  $\text{CH}_2$  skupinom piridinskog prstena. Također, za isti spoj vidljive su sprege između NH jezgre s atomima C-4, C-6' i C-2' kroz tri veze. Zahvaljujući ostalim spregama u  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  HMBC spektru, potvrđeni su i pripadajući signali za spoj **P4**. Kod spoja P4 vidljive su sprege kroz tri veze između jezgre atoma H- $\alpha$  s atomima C-1' i C-3 te kroz dvije veze s atomom C-4.

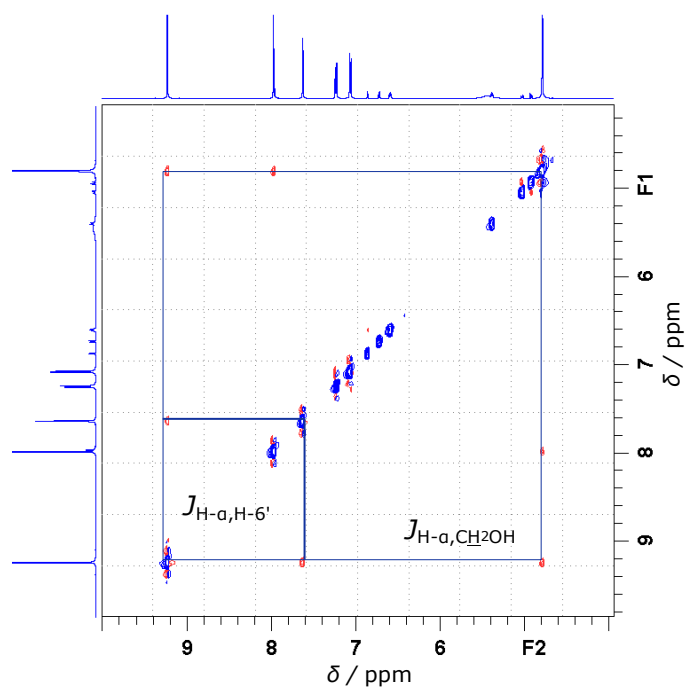


**Slika 34.**  $^1\text{H}$ — $^{13}\text{C}$  HMBC spektar spojeva **P3** (označeno crvenom) i **P4** (označeno plavom).

Križni signal u  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  COSY spektru spoja **P3**, označen na slici 35, pokazuje spregu između jezgre atoma H- $\alpha$  i NH, odnosno potvrđuje nastanak Schiffove baze (Slika 31). Iz  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  NOESY spektra, koji prikazuje dipolnu spregu između jezgre atoma H- $\alpha$  i H-6' te H- $\alpha$  i  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , određena je međusobna orijentacija benzenskog i piridinskog prstena Schiffove baze kod spoja **P4** (Slika 36).

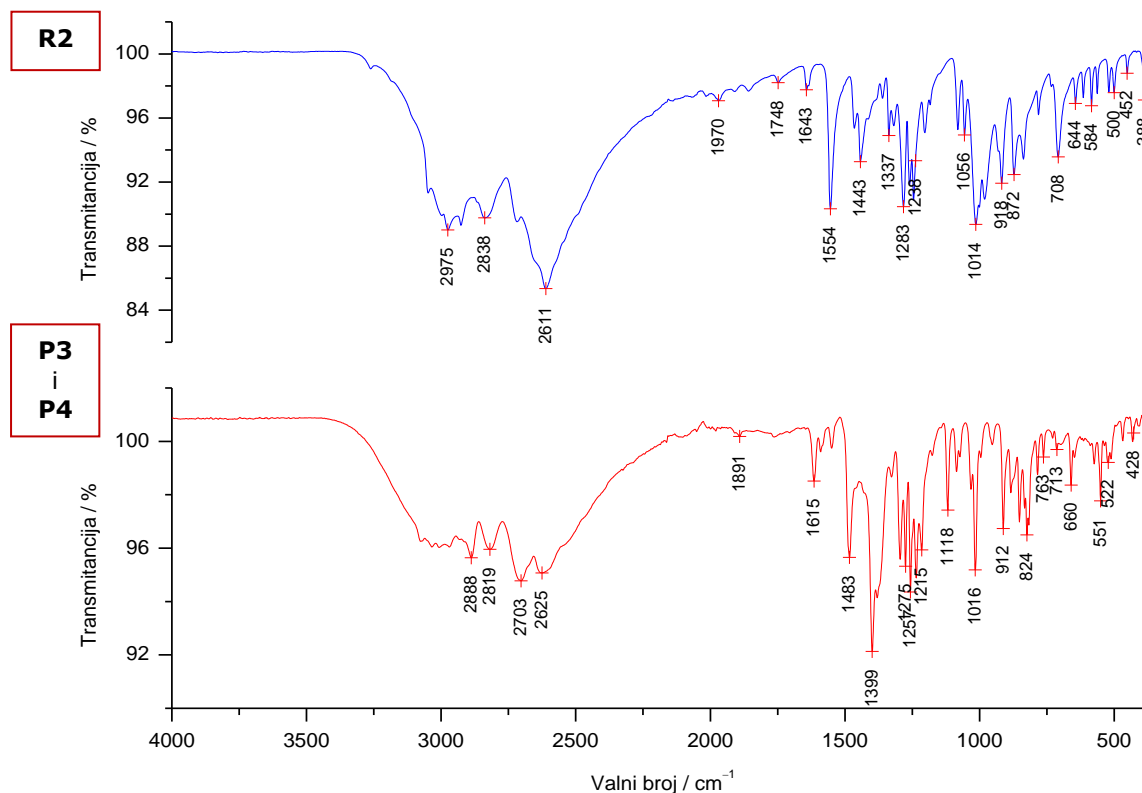


**Slika 35.**  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  COSY spektar spoja **P3**.



**Slika 36.**  $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$  NOESY spektar spoja **P4**.

Nestanak aldehidne vrpce istezanja pri  $1748\text{ cm}^{-1}$  u spektru IR zračenja spojeva **P3** i **P4** (Slika 37.B), kao i pojava nove vrpce pri  $1615\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje istezanju C=N skupine potvrđuje nastanak Schiffove baze (Slika 31). Kod vrpce u C=C i C=N području istezanja također su primijećene razlike u valnim brojevima u odnosu na one kod reaktanta **R2** (Slika 37).



**Slika 37.** FT-IR spektri spojeva **R2** te **P3** i **P4**.

U smjesi spojeva **P3** i **P4** spektar masa pokazuje molekularni ion pri vrijednosti  $m/z$  293,0.

## 6. ZAKLJUČAK

Sinteza aminokiselinskih estera s  $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksinom (IBP) u reakciji esterifikacije sa zaštićenim aminokiselinama i to primjenom klasične metode uz dicikloheksilkarbodiimid (DCC), rezultirala je nastankom Boc- ili Z-N-zaštićenih estera, Z-L-Phe-IBP (**P1**) i Boc-Ala-IBP (**P2**). Također, reakcijom piridoksala i 2-amin-4-klorfenola, kondenzacijom uz refluks, sintetizirana je Schiffova baza koja pokazuje keto-aminsku (**P3**) te enol-iminsku (**P4**) tautomeriju. Iskorištenja dobivenih spojeva u rasponu su od 65,9 do 91,2 %.

Vezanjem aminokiseline, ali i zbog vezanog izobutilena, u  $^1\text{H}$  spektru spoja **P1** opaženo je zasjenjenje signala  $^1\text{H}$  jezgri kod atoma  $\text{CH}_3$ -2 za  $-0,24$  ppm i H-6 za  $-0,29$  ppm. Kod spoja **P2**, iste su jezgre atoma zasjenjene za  $-0,28$  ppm ( $\text{CH}_3$ -2), odnosno za  $-0,14$  ppm (H-6). U spojevima **P1** i **P2**, atomi C-3, C-4 i C-5 piridinskog prstena direktno sudjeluju u vezanju što je vidljivo po razlici u pomaku signala u spektru  $^{13}\text{C}$  APT kod slobodnog reaktanta (**R1**) i pripravljenog spoja. Kod spoja **P1**, vidljivo je zasjenjenje signala C-3 za  $-4,7$  ppm, C-4 za  $-7,2$  ppm te C-5 za  $-4,8$  ppm, a kod spoja **P2** zasjenjenje signala C-3 za  $-2,2$  ppm, C-4 za  $-0,5$  ppm te C-5 za  $-4,6$  ppm. Nastanak novih vrpce istezanja O—H skupine u području od  $3500 - 2750\text{ cm}^{-1}$  u spektru IR zračenja, kao i nastanak vrpce karbonilne skupine i to kod spoja **P1** pri  $1698\text{ cm}^{-1}$  te kod spoja **P2** pri  $1755\text{ cm}^{-1}$ , potvrđuju nastanak spojeva i u čvrstom stanju.

Nastanak Schiffove baze (**P3**, **P4**) potvrđuje nestanak signala aldehidnog H-atoma pri  $6,46$  ppm i nastanak novih signala jezgre H- $\alpha$  atoma u  $^1\text{H}$  spektru NMR i to pri  $6,58$  ppm (**P3**), odnosno pri  $9,23$  ppm (**P4**). Također, nastankom Schiffove baze zasjenjuju se gotovo sve jezgre  $^1\text{H}$ -atoma piridoksalnog prstena (do  $\approx -0,1$  ppm). Nestanak aldehidne vrpce istezanja pri  $1748\text{ cm}^{-1}$  u spektru IR zračenja spojeva **P3** i **P4**, kao i pojava nove vrpce pri  $1615\text{ cm}^{-1}$ , koja se pripisuje istezanju C=N skupine, potvrđuje nastanak Schiffove baze i u čvrstom stanju. U spektru masa pri pozitivnoj ionizaciji zabilježen je molekularni signal nastalog spoja.

Pitanje selektivnog uklanjanja zaštitne skupine s aminokiselinskog dijela derivata ostaje otvoreno za daljnja istraživanja. Također, nastavak ovog istraživanja usmjeriti će se na dokazivanje poboljšanih bioloških svojstava sintetiziranih spojeva vezanih uz njihovo selektivno i toksično djelovanje spram raznih tumorskih stanica.

## 7. LITERATURA

- 1 Lieberman S, Bruning NP. *The Real Vitamin and Mineral Book, 4th edition: The Definitive Guide to Designing Your Personal Supplement Program*. Penguin, 2007.
- 2 Jr GFC, McClung JP. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Academic Press, 2016.
- 3 Vitamini | Definicija hrane. <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/> (accessed 9 Jun2018).
- 4 Arévalo SP, Scott TM, Falcón LM, Tucker KL. Vitamin B-6 and depressive symptomatology, over time, in older Latino adults. *Nutr Neurosci* 2018; : 1–12.
- 5 Spinas E, Saggini A, Kritas SK, Cerulli G, Caraffa A, Antinolfi P *et al*. CROSSTALK BETWEEN VITAMIN B AND IMMUNITY. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015; **29**: 283–288.
- 6 Preedy VR. *B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. Royal Society of Chemistry, 2012.
- 7 Tomioka Y, Numata S, Kinoshita M, Umehara H, Watanabe S-Y, Nakataki M *et al*. Decreased serum pyridoxal levels in schizophrenia: meta-analysis and Mendelian randomization analysis. *J Psychiatry Neurosci JPN* 2018; **43**: 170053.
- 8 Basu U, Pant I, Hussain A, Kondaiah P, Chakravarty AR. Iron(III) complexes of a pyridoxal Schiff base for enhanced cellular uptake with selectivity and remarkable photocytotoxicity. *Inorg Chem* 2015; **54**: 3748–3758.
- 9 Hazari PP, Pandey AK, Chaturvedi S, Tiwari AK, Chandna S, Dwarakanath BS *et al*. Synthesis of oxovanadium(IV) Schiff base complexes derived from C-substituted diamines and pyridoxal-5-phosphate as antitumor agents. *Chem Biol Drug Des* 2012; **79**: 223–234.
- 10 Chemistry, The Madura College, / Madurai Kamaraj University, India, Xavier DA, Srividhya N. Synthesis and Study of Schiff base Ligands. *IOSR J Appl Chem* 2014; **7**: 06–15.
- 11 Gilli G, Gilli P. *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*. Oxford University Press: Oxford, New York, 2009.
- 12 preview.pdf. <https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:270/preview> (accessed 2 Jul2018).
- 13 da Silva CM, da Silva DL, Modolo LV, Alves RB, de Resende MA, Martins CVB *et al*. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *J Adv Res* 2011; **2**: 1–8.
- 14 Murtaza G, Mumtaz A, Khan FA, Ahmad S, Azhar S, Khan SA *et al*. Recent pharmacological advancements in schiff bases: a review. *Acta Pol Pharm* 2014; **71**: 531–535.
- 15 Gupta KC, Sutar AK. Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coord Chem Rev* 2008; **252**: 1420–1450.
- 16 Kocienski PJ. *Protecting Groups*. Thieme, 2005.

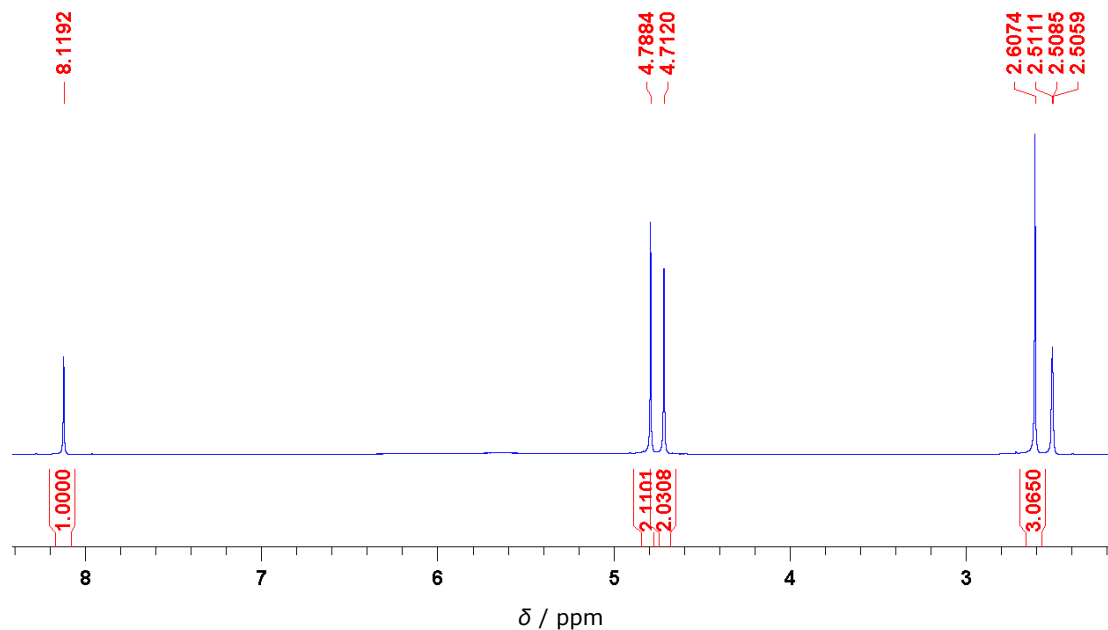


- 17 McOmie J. *Protective Groups in Organic Chemistry*. Springer Science & Business Media, 2012.
- 18 Pedersen SW, Armishaw CJ, Strømgaard K. Synthesis of peptides using tert-butyloxycarbonyl (Boc) as the  $\alpha$ -amino protection group. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2013; **1047**: 65–80.
- 19 Itoh M, Hagiwara D, Kamiya T. Peptides. VI. Some Oxime Carbonates as Novel *t*-Butoxycarbonylating Reagents. *Bull Chem Soc Jpn* 1977; **50**: 718–721.
- 20 Tarbell DS, Yamamoto Y, Pope BM. New Method to Prepare N-*t*-Butoxycarbonyl Derivatives and the Corresponding Sulfur Analogs from di-*t*-Butyl Dicarbonate or di-*t*-Butyl Dithiol Dicarbonates and Amino Acids. *Proc Natl Acad Sci* 1972; **69**: 730–732.
- 21 Smith MB. *Organic Synthesis*. Academic Press, 2016.
- 22 Lundt BF, Johansen NL, Vølund A, Markussen J. Removal of *t*-butyl and *t*-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. Mechanisms, biproduct formation and evaluation of scavengers. *Int J Pept Protein Res* 1978; **12**: 258–268.
- 23 Stahl GL, Walter R, Smith CW. Preparation and characterization of beaded poly (N-acrylylpyrrolidine): bidirectional synthesis of Cys-, His-, Gln-, or Glu-containing polypeptides. *J Am Chem Soc* 1979; **101**: 5383–5394.
- 24 Jakubke H-D, Sewald N. *Peptides from A to Z: A Concise Encyclopedia*. John Wiley & Sons, 2008.
- 25 Kaplan D, McGrath K. *Protein-Based Materials*. Springer Science & Business Media, 1997.
- 26 Friebolin H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. Wiley, 2010.
- 27 Canet D. *Cross-relaxation and Cross-correlation Parameters in NMR: Molecular Approaches*. Royal Society of Chemistry, 2017.
- 28 Jacobsen NE. *NMR Data Interpretation Explained: Understanding 1D and 2D NMR Spectra of Organic Compounds and Natural Products*. John Wiley & Sons, 2016.
- 29 Rule GS, Hitchens TK. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2005.

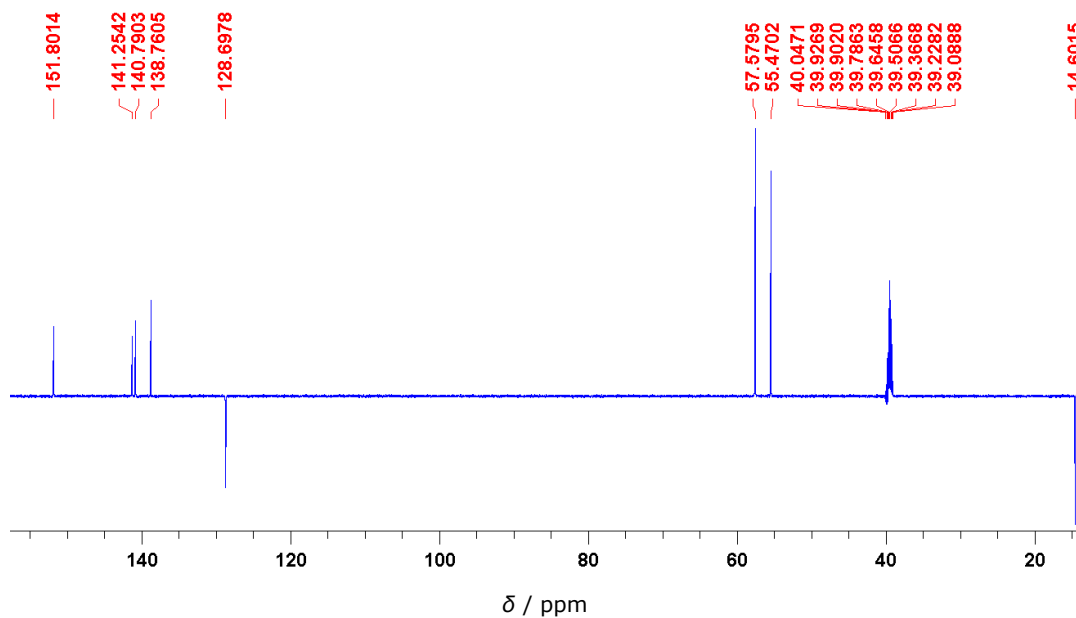
## 8. DODATAK

### 8.1. Spektri NMR, IR zračenja te spektri masa reaktanata i produkata

Piridoksin (**R1**)

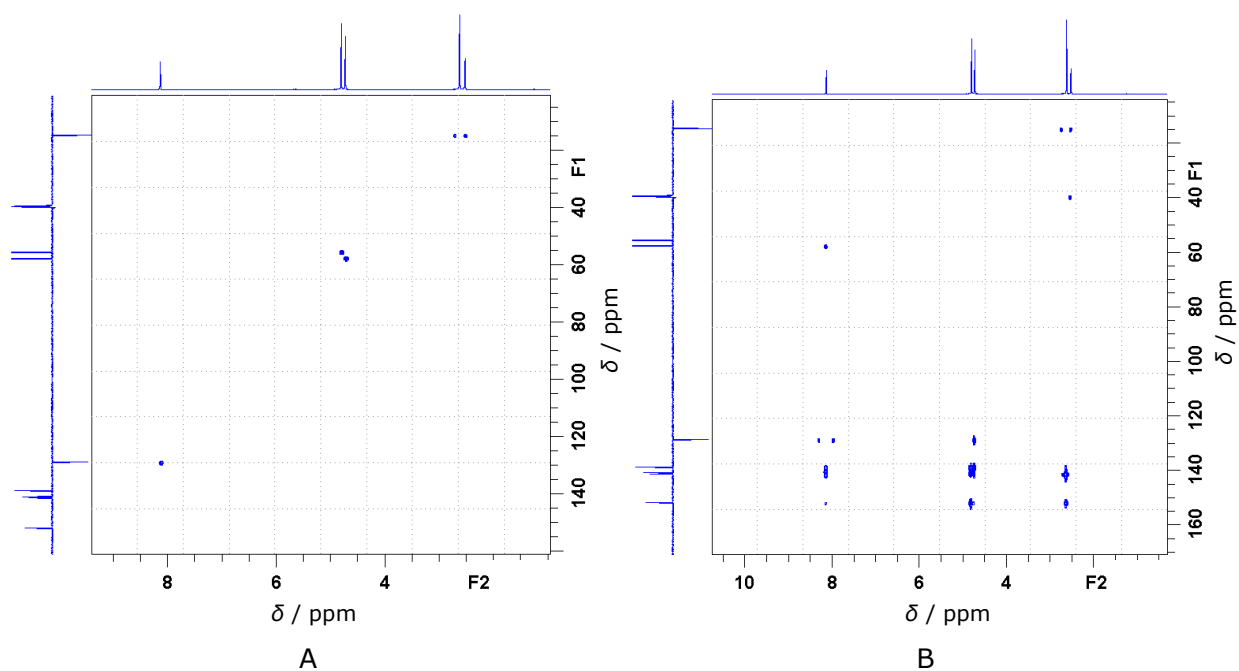


A

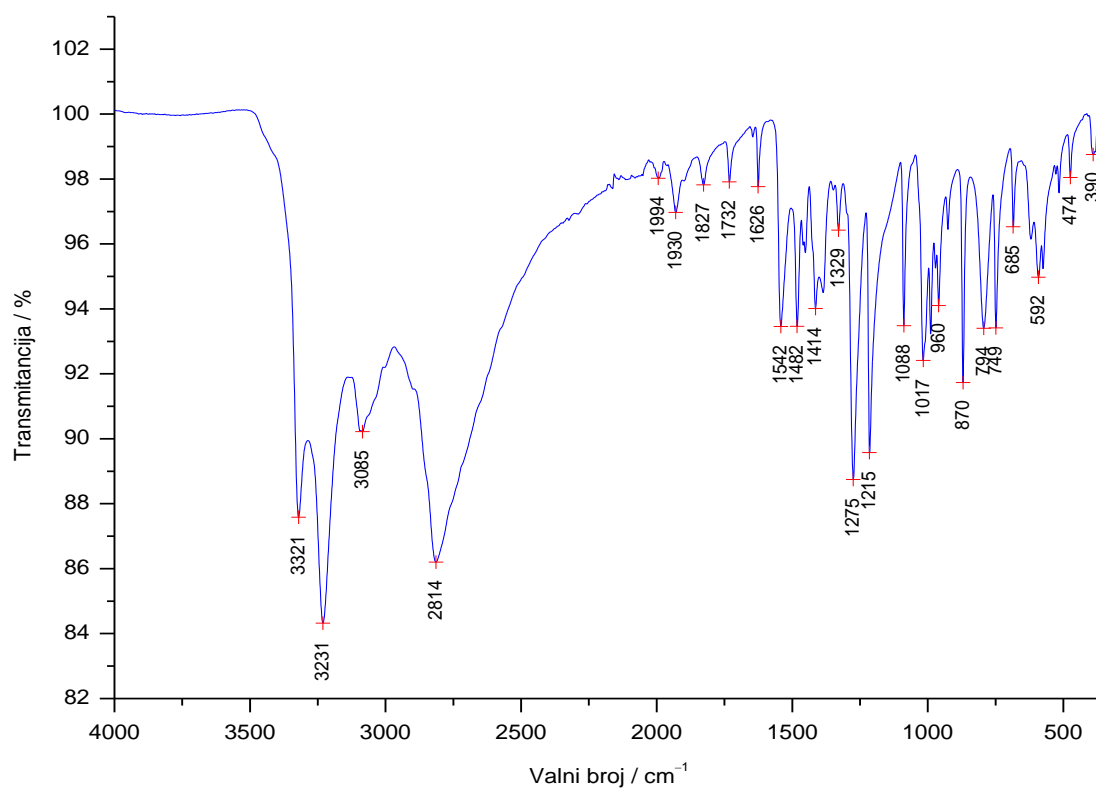


B

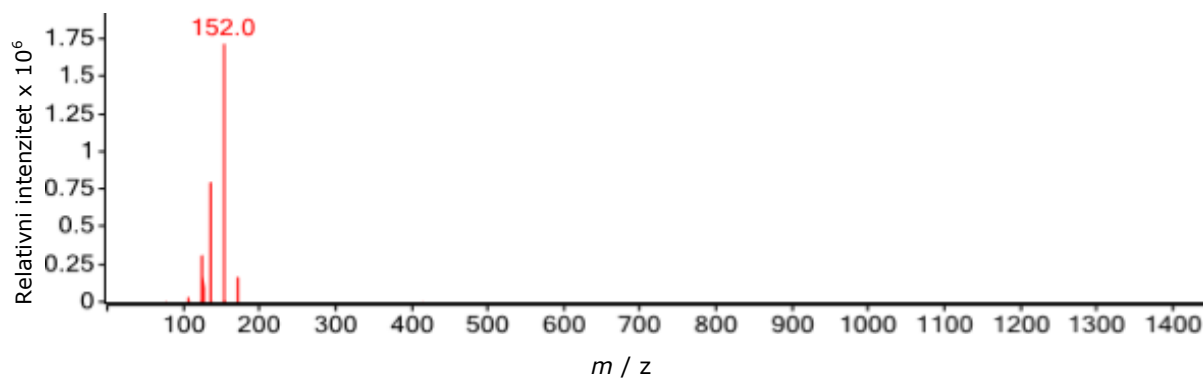
**Slika D1.** A)  $^1\text{H}$  i B)  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **R1**.



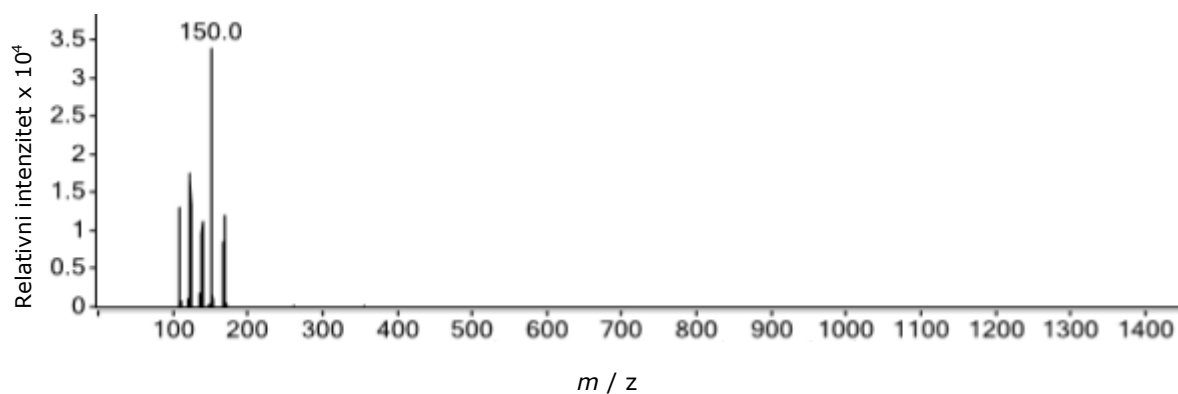
**Slika D2.** A)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC i B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektar spoja **R1**.



**Slika D3.** FT-IR spektar spoja **R1**.



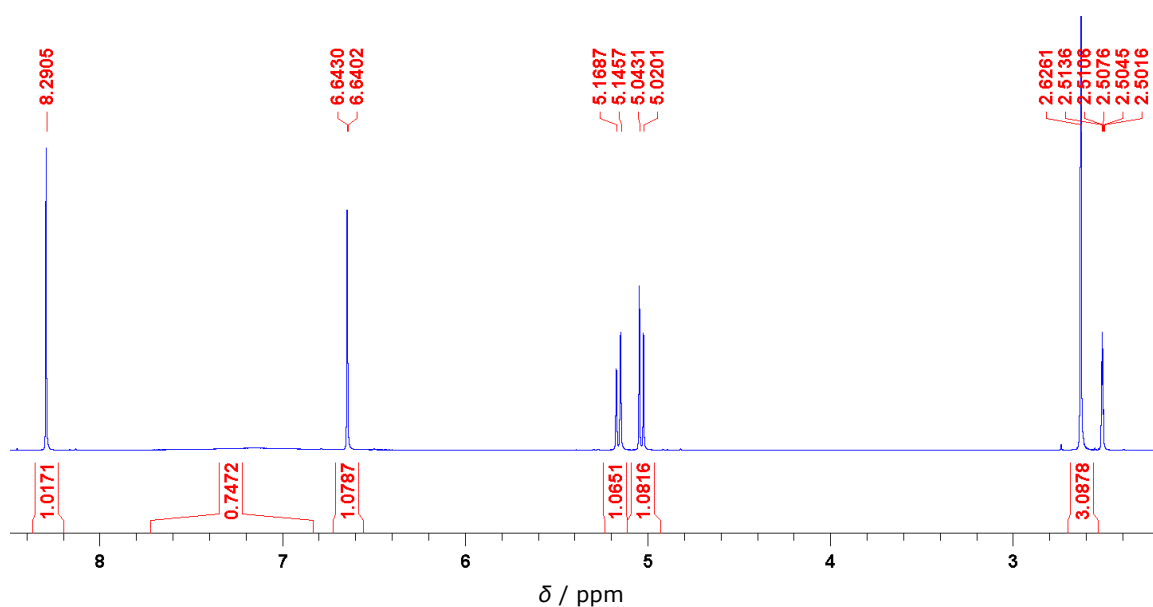
A



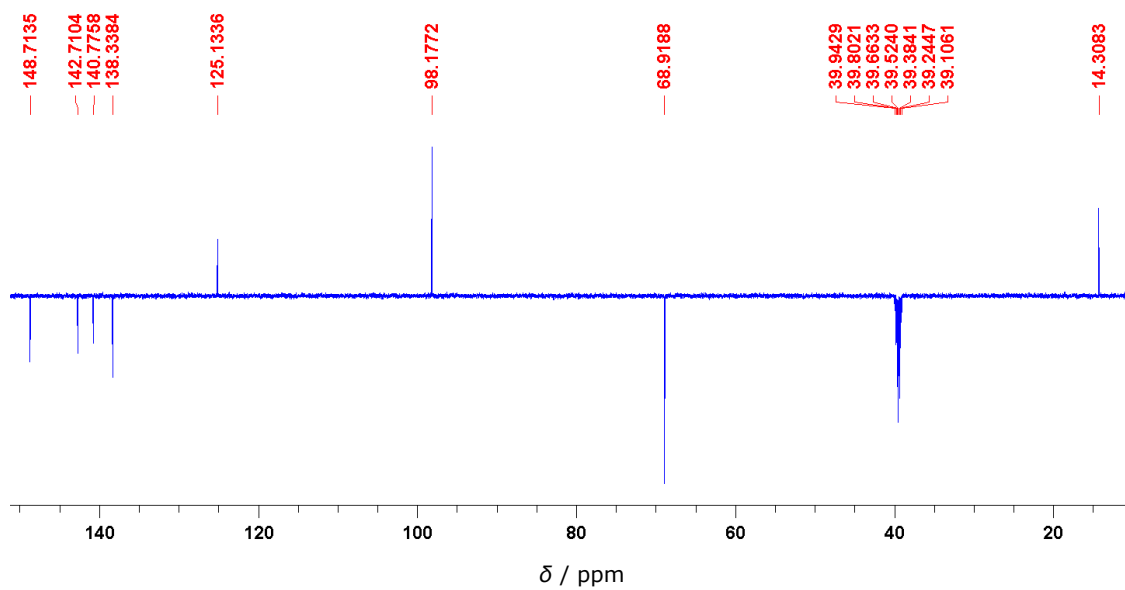
B

**Slika D4.** A) ESI<sup>+</sup>-MS i B) ESI<sup>-</sup>-MS spektar spoja **R1**.

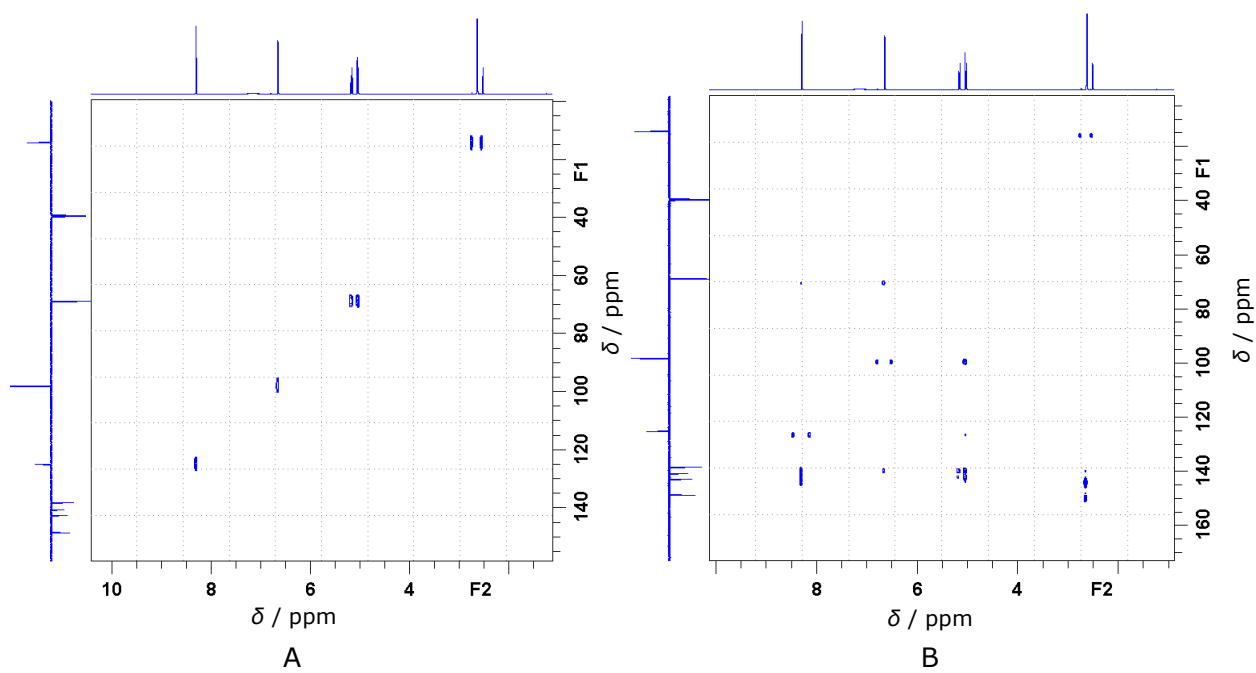
Piridoksal x HCl (**R2**)



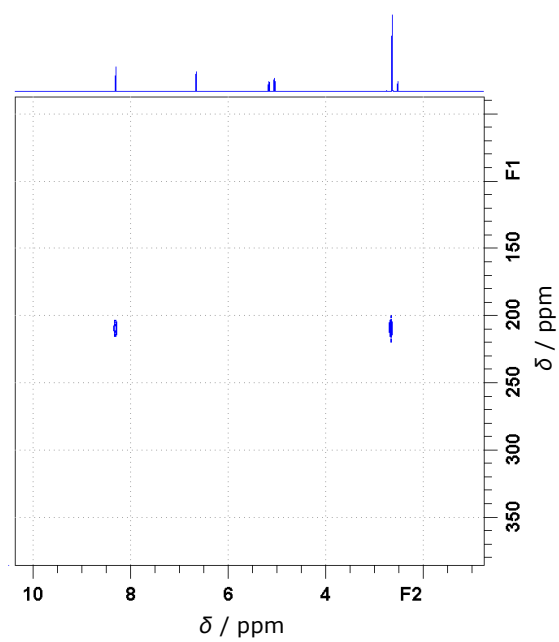
**Slika D5.** <sup>1</sup>H spektar spoja **R2**.



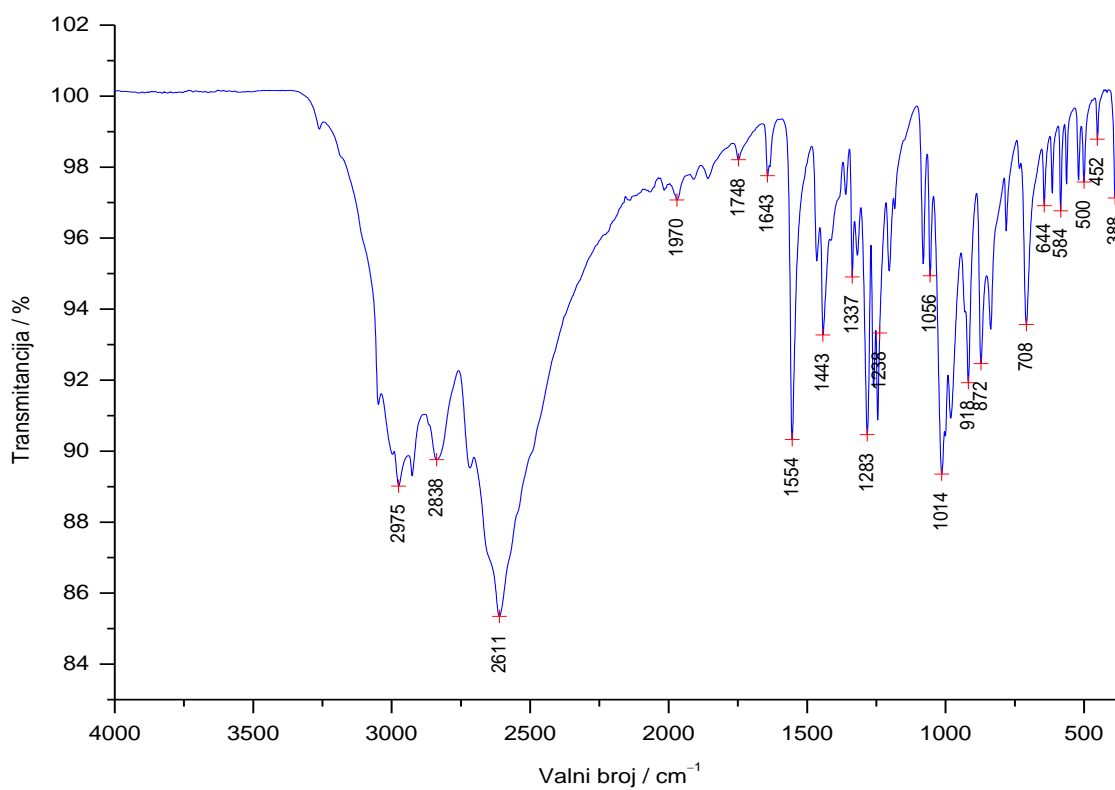
**Slika D6.**  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **R2**.



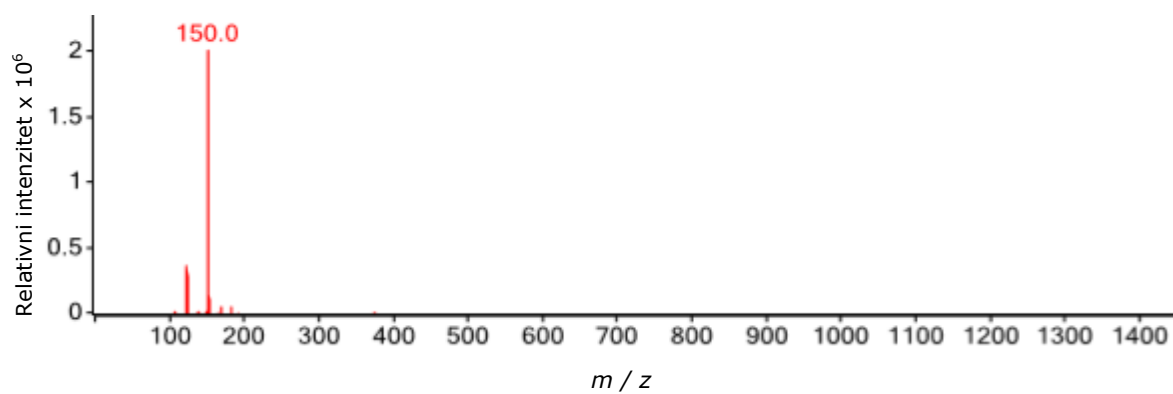
**Slika D7.** A)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC i B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektar spoja **R2**.



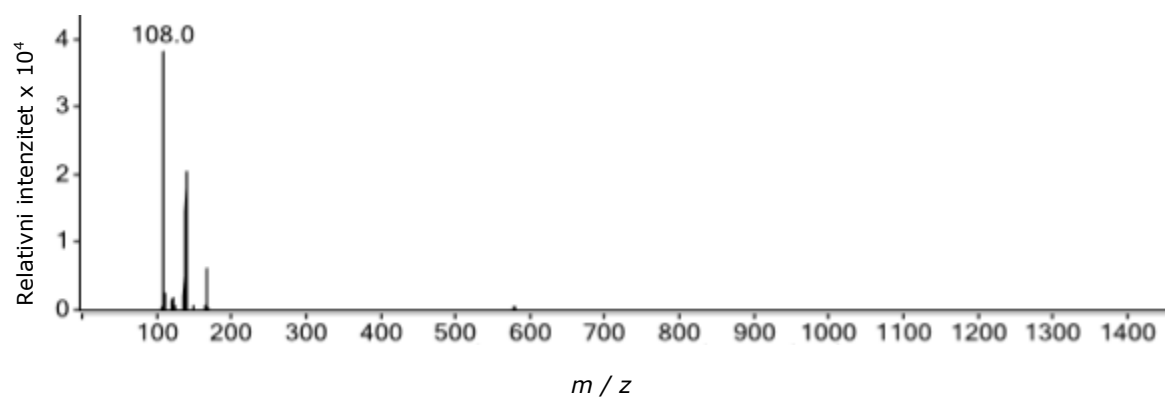
**Slika D8.**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC spoja **R2**.



**Slika D9.** FT-IR spektar spoja **R2**.



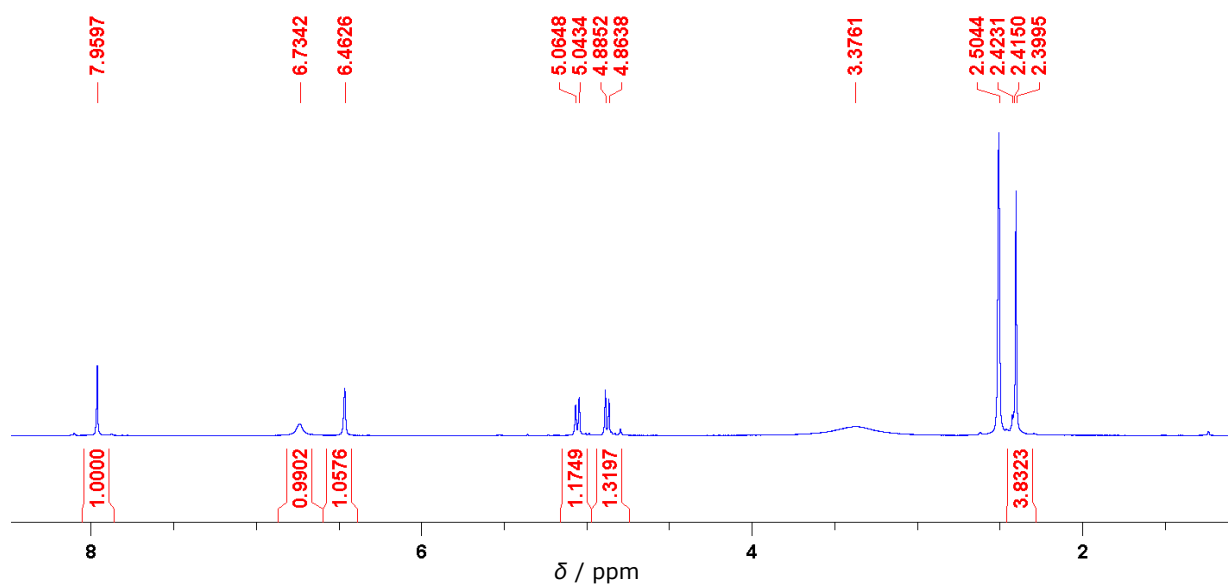
A



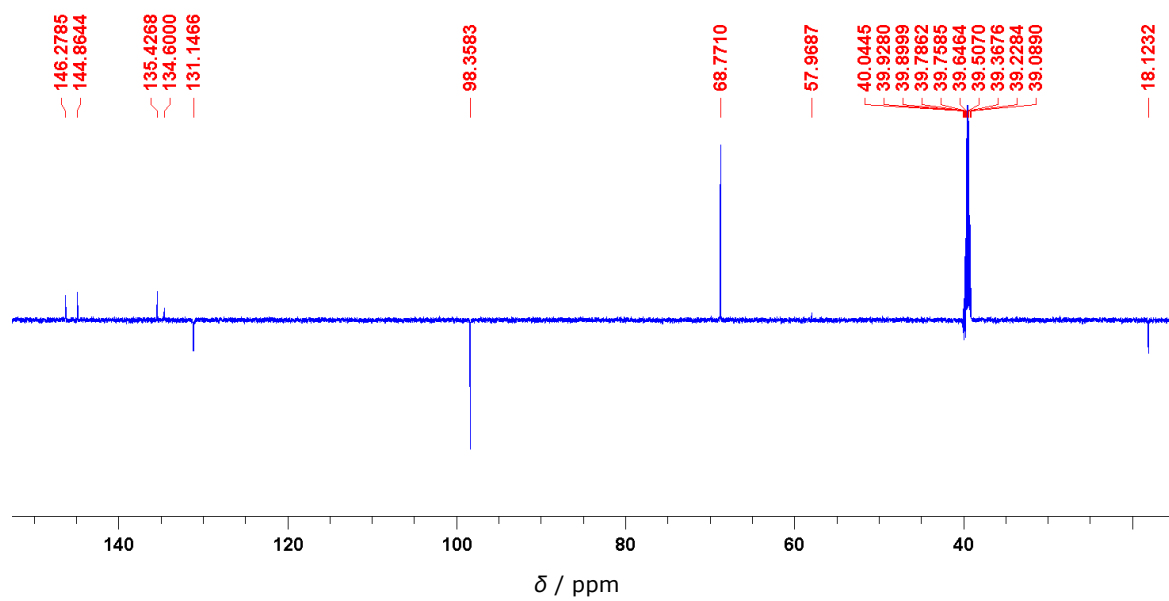
B

**Slika D10.** A) ESI<sup>+</sup>-MS i B) ESI<sup>-</sup>-MS spektar spoja **R2**.

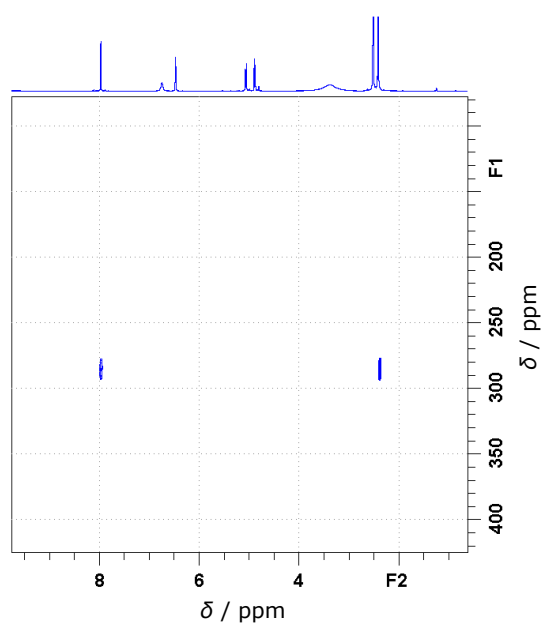
Neutralni piridoksal (**R3**)



**Slika D11.** <sup>1</sup>H spektar spoja **R3**.



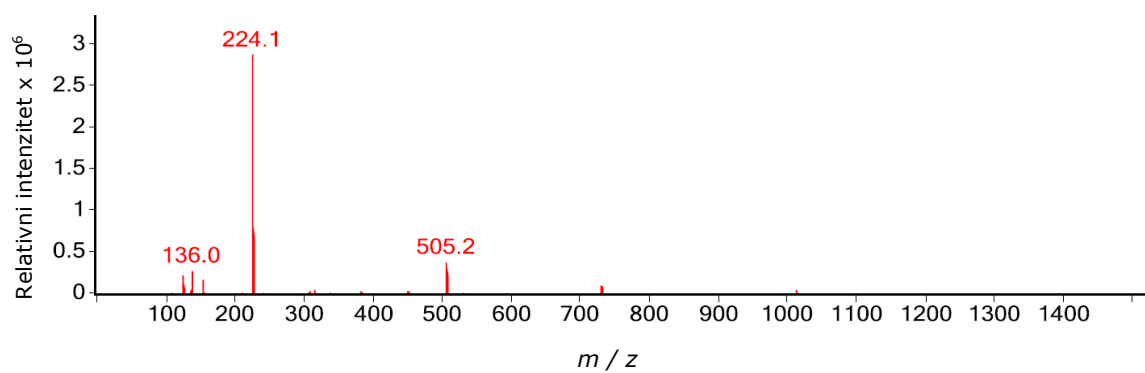
**Slika D12.**  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **R3**.



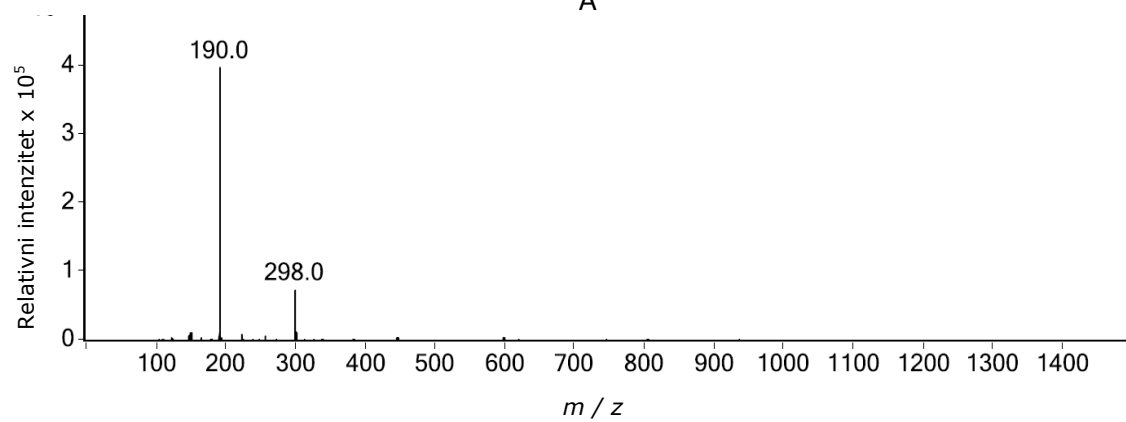
**Slika D13.**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC spoja **R3**.



*Z-L-Phe- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin (P1)*



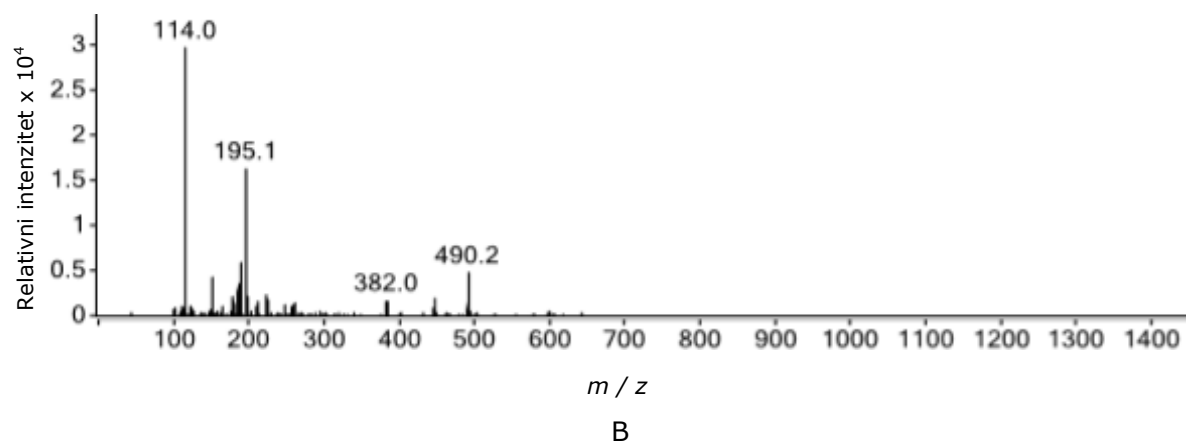
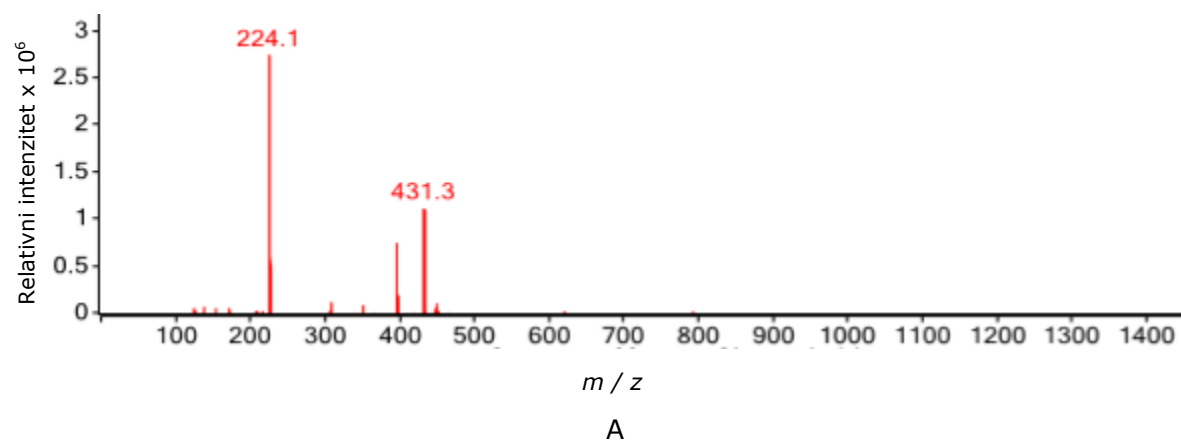
A



B

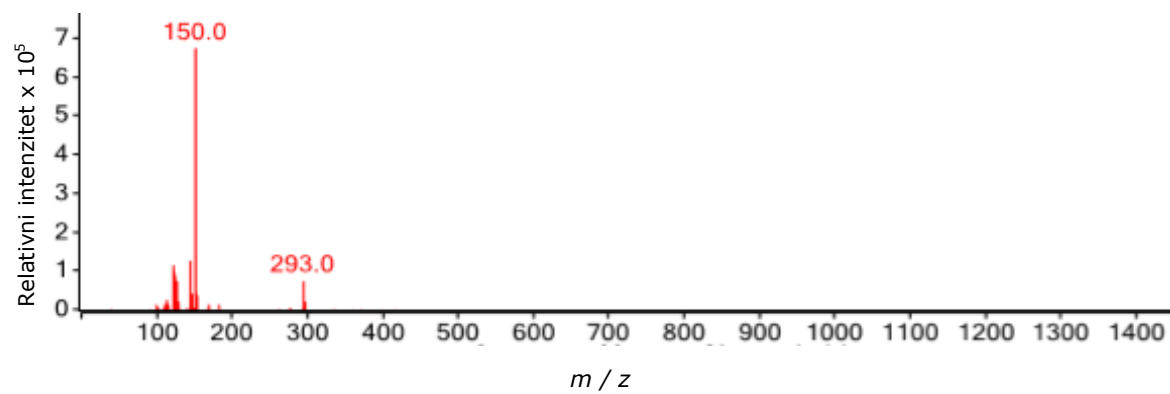
**Slika D14.** A) ESI<sup>+</sup>-MS i B) ESI<sup>-</sup>-MS spektar spoja **P1**.

*Boc-Ala- $\alpha^4, \alpha^5$ -izobutiliden piridoksin (P2)*

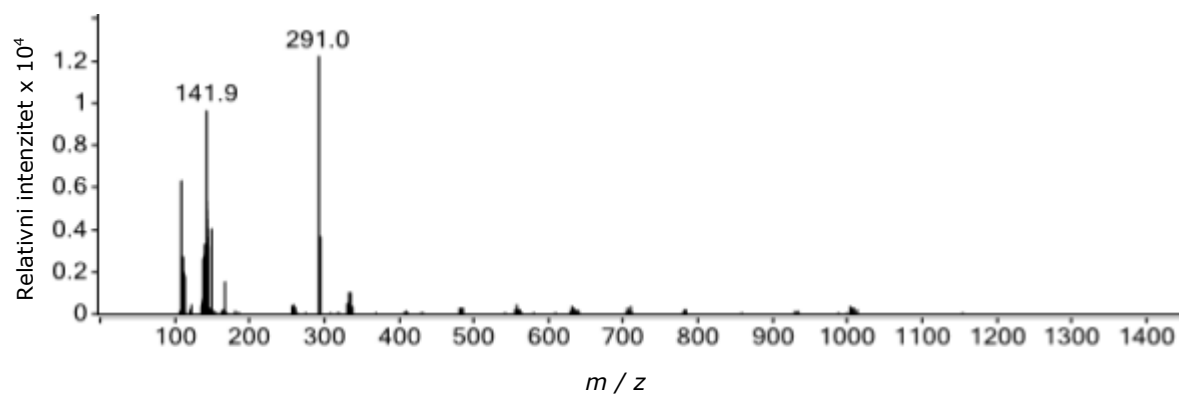


**Slika D15.** A) ESI<sup>+</sup>-MS i B) ESI<sup>-</sup>-MS spektar spoja **P2**.

*N*-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksamin (**P3**) i  
*N*-(2-hidroksi-5-klorfenil)piridoksalimin (**P4**)



A



B

**Slika D16.** A) ESI<sup>+</sup>-MS i B) ESI<sup>-</sup>-MS spektar spojeva **P3** i **P4**.

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBN INFORMACIJE

Dajana Busić

📍 Dr. Jože Gabrovška 12, 51000 Rijeka, Hrvatska

☎ (+385) 919147896

✉ dajana.busic@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2016. — danas    **Diplomski sveučilišni studij "Medicinska kemija"**

Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju  
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Hrvatska

2013. — 2016.    **Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja  
lijekova**

Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju  
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Hrvatska

2009. — 2013.    **Završeno gimnazijsko obrazovanje**

Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci  
Ljudevita Gaja 1, 51000 Rijeka, Hrvatska

### RADNO ISKUSTVO

3/2018. — 9/2018.    **Izrada diplomskog rada**

Institut Ruđer Bošković, Centar za NMR,  
Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska  
Tema: *Istraživanje derivata vitamina B<sub>6</sub> jednodimenzijskim i  
dvodimenzijskim tehnikama NMR*  
Mentor: prof. dr. sc. Dražen Vikić-Topić, IRB i Odjel za  
biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci  
Komentor rada: dr. sc. Sunčica Roca, IRB

5/2016. – 6/2016. Stručna praksa

Jadran galenski laboratorij, JGL d.d.  
Svilno 20, 51000 Rijeka, Hrvatska

Sektor: Kontrola kvalitete

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C1	C1	B2	B2	C1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

### Komunikacijske vještine

- Komunikativna sam i vedra osoba, sposobna za brzo prilagođavanje novom okruženju.
- Spremna sam za samostalno i odgovorno pristupanje rješavanju zadataka, ali i na timski rad.

### Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

## DODATNE INFORMACIJE

Stipendije Korisnica stipendije Grada Rijeke od 2014. do 2017. godine.

Promocija znanosti  
i natjecanja

13. Festival znanosti, Otvoreni dani Odjela za  
biotehnologiju, 2015.

Sudjelovanje u organizaciji i provedbi cjelodnevnog predstavljanja praktikuma za mikroskopiranje učenicima osnovnih i srednjih škola.

15. Festival znanosti, Otvoreni dani Odjela za  
biotehnologiju, 2017.

Sudjelovanje u organizaciji i provedbi natjecanja Tetragon (biologija) za učenike srednjih škola.

Case Study, 2015.

Case Study natjecanje tvrtke JGL d.d. bazirano na rješavanju problema unutar sektora Kontrole kvalitete.

Kongresi

6. — 8. 10. 2017.

International Experimental Biology and Medicine Conference  
Odjel za biotehnologiju, Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka,  
Hrvatska  
Tema: *Biological clocks: mechanisms and application*